

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«15» ноября 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)
rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (IL28В) в
клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® Геноскрин-IL28В-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	8
ФОРМАТ FRT.....	9
СОСТАВ.....	9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	11
А. Подготовка пробирок для амплификации	11
Б. Проведение амплификации	13
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	21
ПРИЛОЖЕНИЕ. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп»	22
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
В-	- отрицательный контроль экстракции
К+	-положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ПКО	- Положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
SNP	-однонуклеотидный полиморфизм

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® Геноскрин-IL28B-FL» предназначен для определения SNP rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (IL28B) в клиническом материале (цельная кровь или мазок с внутренней поверхности щеки (буккальный эпителий)) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на экстракции тотальной ДНК человека из образцов клинического материала и проведении ПЦР-амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» фрагментов ДНК человека, содержащих SNP rs8099917 и rs12979860 в гене IL28B и участка гена, кодирующего β-глобин человека, в качестве эндогенного внутреннего контроля (ВКО). ВКО позволяет контролировать все этапы анализа и оценивать влияние ингибиторов ПЦР на результаты исследования.

Анализ одного образца проводится в двух пробирках, в одной из которых определяются SNP rs8099917 и ВКО, в другой - SNP rs12979860 и ВКО. Набор реагентов позволяет дифференцировать гомо- и гетерозиготное состояние по каждому из исследуемых SNP. Набор разработан для приборов, имеющих три и более канала детекции флуоресценции. В таблице 1 указаны каналы, по которым

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

детектируются нуклеотидные варианты исследуемых SNP и ВКО.

Таблица 1

Детекция SNP

Реакционная смесь	«rs17»	«rs60»
Канал для флуорофора	Выявляемые нуклеотиды	
FAM	T	T
JOE	G	C
ROX	ВКО	ВКО

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате:

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «Гемолитик» (1 флакон), РНК-буфер (1 пробирка), «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 4 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 4 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Объем экстракции, мкл	Вид клинического материала	Аналитическая чувствительность, копий/мл
100	Цельная кровь, мазок с внутренней поверхности щеки (буккальный эпителий)	5×10^3

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми аллелями в пределах каждого исследуемого SNP при использовании высококонцентрированных положительных контрольных образцов и клинических образцов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы,

оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда - «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-2009)
2. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-

01897593-08) – при работе с формами комплектации 2 и 3.

3. «Гемолитик» – реагент для селективного лизиса эритроцитов крови при предобработке клинического материала (цельной периферической и луповинной крови) (ТУ 9398-097-01897593-2010). При работе с формами комплектации 2 и 3 (при выделении ДНК из образцов цельной крови).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
5. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
6. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой - при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахугеп, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.
7. Пробирки объемом 0,5 мл для приготовления реакционной смеси (например, Ахугеп, США).
8. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
9. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
10. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл в штативах (например, Ахугеп, США).
11. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

14. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат: свежая цельная кровь, мазок с внутренней поверхности щеки (буккальный эпителий).

Контейнер с материалом доставляется в лабораторию в емкости со льдом в течение сут.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

– Свежая цельная кровь

Взятие крови проводится в количестве 2,0 мл в одноразовую пробирку с 0,2 мл 3 % раствора ЭДТА. Закрытую пробирку с цельной кровью переворачивают 3-4 раза для равномерного перемешивания с ЭДТА. Допускается хранение образца цельной крови при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч.

– Мазок с внутренней поверхности щеки (буккальный эпителий)

Мазок берут сухим стерильным зондом с ватным тампоном. После получения материала рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку вместимостью 1,5-2,0 мл с крышкой с 0,5 мл «Транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-09). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают. Допускается хранение образца при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 сут.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ²	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

К комплекту реагентов «РИБО-преп» прилагаются следующие реагенты:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК человека, содержащих SNP rs8099917 и rs12979860 в гене IL28B с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT IL28B rs8099917	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT IL28B rs12979860	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО ДНК IL28B rs8099917	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО ДНК IL28B rs12979860	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

² При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °C возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

TE-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	2 пробирки
----------	--------------------------------	------	------------

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 тестов (110 реакций амплификации), включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

К комплекту реагентов прилагается отрицательный контрольный образец этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК человека, содержащих SNP rs8099917 и rs12979860 в гене IL28B с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT IL28B rs8099917	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-1-FRT IL28B rs12979860	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ПКО ДНК IL28B rs8099917	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО ДНК IL28B rs12979860	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
TE-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 тестов (220 реакций амплификации), включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

К комплекту реагентов прилагается отрицательный контрольный образец этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (IL28В) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Геноскрин-IL28В-FL»», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп», в соответствии с Приложением «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»».

В качестве отрицательного контроля экстракции (В-) используют ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

1. Разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб (один контроль экстракции ДНК, два контроля

амплификации).

ВНИМАНИЕ! Каждый образец анализируется с использованием двух реакционных смесей, поэтому для каждого образца необходимо приготовить 2 пробирки.

3. Отобрать две пробирки объемом 0,5 мл для приготовления реакционных смесей.

Промаркировать пробирки «rs17» и «rs60».

4. Смешать в пробирке, промаркированной «rs17», следующие реактивы из расчета на 1 реакцию: 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT /L28B rs8099917 (см. также табл. 2).

5. Смешать в пробирке, промаркированной «rs60», следующие реактивы из расчета на 1 реакцию: 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT /L28B rs12979860 (см. также табл. 2).

ВНИМАНИЕ! Реакционные смеси необходимо готовить с запасом на 1 образец (см. табл. 2).

6. Перемешать подготовленные смеси и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.

7. Внести в пробирки, предназначенные для проведения амплификации, по 15 мкл подготовленной реакционной смеси, т.е. реакционная смесь «rs17» вносится в пробирки, приготовленные для амплификации фрагмента, содержащего SNP rs8099917; реакционная смесь «rs60» вносится в пробирки, приготовленные для амплификации фрагмента, содержащего SNP rs12979860.

8. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов, причем каждый образец, в том числе отрицательный контроль экстракции (В-), необходимо внести в 2 пробирки, содержащие раскапанные реакционные смеси «rs17» и «rs60».

9. Поставить контрольные реакции:

а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирки с раскапанными реакционными смесями «rs17» и «rs60» по 10 мкл ТЕ-буфера.

б) положительный контроль ПЦР (К_{rs17}) – в пробирку с реакционной смесью «rs17» внести 10 мкл ПКО ДНК /L28B rs8099917;

в) положительный контроль ПЦР (К_{rs60}) – в пробирку с реакционной смесью «rs60» внести 10 мкл ПКО ДНК /L28B rs12979860.

Таблица 2

Схема приготовления реакционных смесей для варианта FRT-100 F

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,50
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ³	ПЦР-смесь-1-FRT ⁴	ПЦР-смесь-2-FRT ⁴	Полимераза (TaqF) ⁴
4	8	90	45	4,5
5	9	100	50	5,0
6	10	110	55	5,5
7	11	120	60	6,0
8	12	130	65	6,5
9	13	140	70	7,0
10	14	150	75	7,5
11	15	160	80	8,0
12	16	170	85	8,5

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации

Приборы роторного типа ⁵				Приборы планшетного типа ⁶		
Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	40 с детекция флуоресц. сигнала		60	50 с детекция флуоресц. сигнала	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по трем каналам - для флуорофоров FAM⁷, JOE⁷ и ROX⁷.

³ Число клинических образцов + 1 контроль этапа экстракции ДНК + 3 контроля ПЦР (N+4, N – количество клинических образцов).

⁴ Объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

⁵ например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁶ например, iCycler iQ5, CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁷ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 реакционного модуля в приборах роторного типа обязательно должна быть заполнена пробиркой из текущего эксперимента, содержащей реакционную смесь «rs17».

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам. В таблице 4 указаны каналы, по которым детектируются нуклеотидные варианты исследуемых SNP и ВКО.

Таблица 4

Реакционная смесь	«rs17»	«rs60»
Канал для флуорофора	Выявляемые нуклеотиды	
FAM	T	T
JOE	G	C
ROX	ВКО	ВКО

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, **отрицательным** в случае отсутствия пересечения с пороговой линией (нет значения C_t или C_p) и **сомнительным** во всех других случаях.

ВНИМАНИЕ! Учет результатов для каждой реакционной смеси проводится отдельно!

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору

реагентов.

Учет результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 5).

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Реакционная смесь	«rs17»			«rs60»		
Контроль	Значение порогового цикла, Ct по каналу для флуорофора					
	FAM	JOE	ROX	FAM	JOE	ROX
B—	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct
K—	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct
K ⁺ _{rs17}	Определен о значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	—	—	—
K ⁺ _{rs60}	—	—	—	Определен о значение меньше граничного	Определен о значение меньше граничного	Определен о значение меньше граничного

Примечание : «—» на данной реакционной смеси не тестируется.

Учет результатов в исследуемых клинических образцах (см. также табл. 6)

ВНИМАНИЕ! При использовании прибора планшетного типа просмотреть данные отдельно по каждому каналу для каждой ПЦР-смеси-1.

Таблица 6

ПЦР-смесь-1	Канал для флуорофора			Обнаружен генотип
	FAM (T)	JOE (G)	ROX (BKO)	
ПЦР-смесь-1-FRT «rs17»		-	значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	TT
	-		значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	GG
	для приборов <u>ротаторного типа</u>			
	$C_t(FAM) > C_t(JOE)$	$C_t(FAM) > C_t(JOE)$	значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	TG
	$C_t(FAM) < C_t(JOE)$	$C_t(FAM) < C_t(JOE)$	значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	TT
	для приборов <u>планшетного типа</u>			
	$C_t(FAM) - C_t(ROX) < N$	$C_t(JOE) - C_t(ROX) < N$	значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	TG
	$C_t(FAM) < C_t(ROX)$		значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	GG
			значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	TT
ПЦР-смесь-1-FRT «rs60»	FAM (T)	JOE (C)	ROX (BKO)	Обнаружен генотип
		-	значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	TT
	-		значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	CC
	для приборов <u>ротаторного типа</u>			
	$C_t(FAM) > C_t(JOE)$	$C_t(FAM) > C_t(JOE)$	значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	CT
	$C_t(FAM) < C_t(JOE)$	$C_t(FAM) < C_t(JOE)$	значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	TT
	для приборов <u>планшетного типа</u>			
	$C_t(FAM) - C_t(ROX) < N$	$C_t(JOE) - C_t(ROX) < N$	значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	CT
	$C_t(FAM) < C_t(ROX)$		значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	CC
			значение C_t <u>меньше</u> граничного значения	TT

Примечание. Граничные значения C_t и N указаны во вкладыше к набору реагентов.

А. Учет результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs17»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определено значение C_t только по каналам для флуорофоров FAM и ROX, при этом значение C_t по каналу для флуорофора ROX не превышает указанное во вкладыше, то по SNP rs8099917 выдается результат «Обнаружен генотип TT».
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определено значение C_t только по каналам для флуорофоров JOE и ROX, при этом значение C_t по каналу для флуорофора ROX не превышает указанное во вкладыше, то по SNP rs8099917 выдается результат «Обнаружен генотип GG».
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX, при этом значение C_t по каналу для флуорофора ROX не превышает указанное во вкладыше, то
 - а) при использовании прибора роторного типа выдается результат «Обнаружен генотип TG» только в том случае, если значение C_t по каналу для флуорофора FAM превышает значение C_t по каналу для флуорофора JOE. Если значение C_t по каналу для флуорофора FAM меньше значения C_t по каналу для флуорофора JOE, результат по каналу для флуорофора JOE не учитывается и выдается результат «Обнаружен генотип TT»;
 - б) при использовании прибора планшетного типа выдается результат «Обнаружен генотип TG» только в том случае, если значение C_t по каждому из каналов для флуорофоров FAM или JOE не более чем на N^8 циклов превышает значение C_t по каналу для флуорофора ROX. Если по одному из каналов для флуорофоров FAM или JOE значение C_t более чем на N циклов превышает значение C_t по каналу для флуорофора ROX, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат «Обнаружен генотип GG» или «Обнаружен генотип TT».
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси не определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE, то

⁸ Значение N для каждого типа прибора указано в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (IL28В) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Геноскрин-IL28В-FL»», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение C_t по каналу для флуорофора ROX превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам для флуорофоров FAM и JOE, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Б. Учет результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs60»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определено значение C_t только по каналам для флуорофоров FAM и ROX, при этом значение C_t по каналу для флуорофора ROX не превышает указанного во вкладыше, то по SNP rs12979860 выдается результат «Обнаружен генотип ТТ».
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определено значение C_t только по каналам для флуорофоров JOE и ROX, при этом значение C_t по каналу для флуорофора ROX не превышает указанного во вкладыше, то по SNP rs12979860 выдается результат «Обнаружен генотип СС».
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX, при этом значение C_t по каналу для флуорофора ROX не превышает указанное во вкладыше, то

а) при использовании прибора роторного типа выдается результат «Обнаружен генотип СТ», только в том случае, если значение C_t по каналу для флуорофора FAM превышает значение C_t по каналу для флуорофора JOE. Если значение C_t по каналу для флуорофора FAM меньше значения C_t по каналу для флуорофора JOE, результат по каналу для флуорофора JOE не учитывается и выдается результат «Обнаружен генотип ТТ»;

б) при использовании прибора планшетного типа выдается результат «Обнаружен генотип СТ», только в том случае если значение C_t по каждому из каналов для флуорофоров FAM или JOE не более чем на N^9 циклов превышает

⁹ Значение N для каждого типа прибора указано в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (IL28В) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Геноскрин-IL28В-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

значение C_t по каналу для флуорофора ROX. Если по одному из каналов для флуорофоров FAM или JOE значение C_t более чем на N циклов превышает значение C_t по каналу для флуорофора ROX, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат «Обнаружен генотип CC» или «Обнаружен генотип TT».

4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, не определены значения C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение C_t по каналу для флуорофора ROX превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам для флуорофоров FAM и JOE, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Детальная информация по анализу и интерпретации результатов, полученных для исследуемых клинических образцов, в зависимости от типа используемого оборудования изложена в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (IL28В) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Геноскрин-IL28В-FL»», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ВНИМАНИЕ!

1. Если значение C_t для обоих контролей K_{rs17}^{+} или K_{rs60}^{+} отсутствует, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации.
2. Если значение C_t хотя бы в одной пробе с положительным контролем этапа ПЦР (K_{rs17}^{+} или K_{rs60}^{+}) превышает указанное во вкладыше граничное значение, необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа амплификации, для всех образцов на той ПЦР-смеси-1, на которой были получены некорректные результаты для соответствующего K^{+} .
3. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) на любой реакционной смеси по каналам для флуорофоров FAM и JOE детектируется положительный сигнал, необходимо повторить ПЦР-

ФОРМАТ FRT

исследование для всех образцов, для которых на этой реакционной смеси по данному каналу в таблице результатов было получено значение C_t , начиная с этапа амплификации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT IL28B rs8099917 и ПЦР-смесь-1-FRT IL28B rs12979860 хранить в защищенном от света месте.

Реагенты «Гемолитик» и РНК-буфер, прилагающиеся к комплекту реагентов «РИБО-преп», хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® Геноскрин IL28B-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹⁰.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации



Е.Л. Никонов

¹⁰ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ПРИЛОЖЕНИЕ. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.

A1. Подготовка клинического материала при выделении ДНК из крови

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.
2. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по 1,0 мл гемолитика и по 100 мкл исследуемых образцов цельной крови в соответствии с маркировкой. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе.
3. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин; затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе; оставить на 5 мин.
4. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин.
5. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Полученный осадок лейкоцитов можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 2 нед или при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

A2. Подготовка клинического материала при выделении ДНК из мазков с внутренней поверхности щеки

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.
2. Пробирки с мазками с внутренней поверхности щеки в «Транспортной среде для хранения и транспортировки респираторных мазков» тщательно перемешать, а затем коротко осадить на вортексе.
3. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести по 100 мкл исследуемых образцов в соответствии с маркировкой.

Б. Лизис клинического материала

1. В промаркированные пробирки с клиническим материалом и пробирку, предназначенную для отрицательного контроля экстракции, внести по 300 мкл раствора для лизиса.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

2. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В-) внести **100 мкл ОКО**.
3. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
4. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.
5. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при **12 тыс g** (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 5 мин.
6. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.
7. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
8. Центрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
9. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
10. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
11. Центрифугировать при **12 тыс g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, тщательно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
13. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
14. Добавить в пробирки по **100 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
15. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Максимальное
число тестов



Код партии



Использовать до



Изделие для in vitro
диагностики



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Дата изменения



Не допускать
попадания
солнечного света



Ограничение
температуры



Дата изготовления



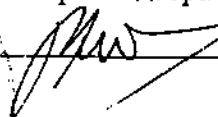
Производитель



Максимальное
число тестов

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 25 листов

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В.Малеев