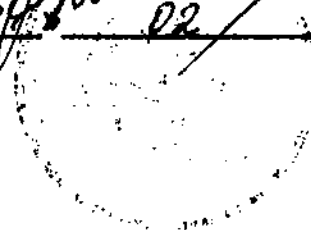


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ №

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

В.И.Покровский
«02» _____ 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления генетического полиморфизма
в гене *ACE* человека методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией
продуктов амплификации в агарозном геле
«АмплиСенс® ACE-I/D-EPh»

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	4
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	5
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	6
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК.....	6
СОСТАВ	7
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	7
ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	7
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	7
А. Подготовка пробирок для амплификации.....	7
Б. Проведение амплификации	8
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	9
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	9
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	12

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ACE-I/D-EPh» предназначен для выявления делеционного полиморфизма (I/D) в гене ангиотензин-превращающего фермента человека (ACE) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Длина делеции – 289 п.н., идентификационный номер полиморфизма в базе данных NCBI – rs4646994.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из образцов периферической крови. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать наборы реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала и набор реагентов «ЭФ» для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление делеционного полиморфизма в гене ангиотензин-превращающего фермента методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией включает в себя три этапа: экстракцию (выделение) РНК/ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка гена ACE человека, и электрофоретическую детекцию продуктов амплификации в агарозном геле. С образцами выделенной ДНК проводится реакция амплификации фрагмента гена ACE, содержащего I/D полиморфизм, при помощи специфических праймеров и фермента Taq-полимеразы. Определение размеров амплифицированных фрагментов осуществляется после окончания ПЦР с помощью электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле.

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

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации.

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,5 мл).

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,2 мл).

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации участка гена *ACE* человека. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК и электрофоретической детекции продуктов амплификации, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

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», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» 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 следует 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 односторонним. 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 (включая буфер и гели) следует удалять в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

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.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- 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. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009) или другие, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
3. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ» (ТУ 9398-070-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
4. Дополнительные материалы и оборудование для электрофоретической детекции – согласно инструкции к комплекту реагентов для электрофоретической детекции.
5. Гемолитик (ТУ 9398-097-01897593-2010).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
7. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
8. Центрифуга/вортекс.
9. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 и от 20 до 200 мкл).
10. Одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл и 200 мкл в штативах.
11. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.

13. Емкость для сброса наконечников.
14. Программируемый амплификатор. Например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентный для пробирок 0,5 мл; Gradient Palm Cyclor, (Corbett Research, Австралия), MaxuGene (Axygen, США) или эквивалентный для пробирок 0,2 мл.
15. Термостат для пробирок типа Эппендорф от 25 до 100 °С

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Для проведения анализа используется цельная периферическая кровь.

Взятие цельной периферической крови проводится в пробирку с 3% раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают для равномерного перемешивания с ЭДТА.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК

В случае использования комплектов реагентов «РИБО-преп» и «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора для экстракции РНК/ДНК необходимо провести пробоподготовку с помощью гемолитика (производство ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). В 1,5 мл пробирку типа Эппендорф внести отдельным наконечником 1,0 мл гемолитика и 0,25 мл цельной крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком.

Полученный осадок лейкоцитов должен быть использован для экстракции РНК/ДНК (в случае экстракции комплектом реагентов «РИБО-преп», добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить РНК/ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R – комплект реагентов для амплификации фрагмента гена ACE – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-R ACE раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,005	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2 red	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов вариант 50 R рассчитан на проведение 55 реакций, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации.
- Электрофоретическая детекция продуктов амплификации.
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию РНК/ДНК из клеток периферической крови проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору для выделения РНК/ДНК («ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Оптимальная концентрация ДНК для проведения ПЦР составляет 1-3 нг/мкл (10-30 нг ДНК на ПЦР-реакцию).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-R ACE для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2 red, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с содержимым пробирки под воском.
3. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР.
4. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внести по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа в экстракции ДНК (ОК).
5. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль (К-) – внести в подготовленную пробирку 10 мкл ТЕ-буфера;
 - б) положительный контроль (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК человека.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 1

Программа амплификации ДНК

	GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) Gradient Palm Cyclor (Corbett Research) MaxyGene (Axygen)		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	45	95 °С	15 с	45
	60 °С	10 с		60 °С	15 с	
	72 °С	15 с		72 °С	20 с	
3	72 °С	2 мин	1	72 °С	2 мин	1
4	4 °С	хранение		4 °С	хранение	

3. После окончания реакции собрать пробирки в штатив и отправить в помещение для детекции продуктов амплификации.

Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С (однако, перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для

размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекцию провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации («ЭФ» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Разделение фрагментов рекомендуется проводить в агарозном геле толщиной около 0,6 см, концентрацией агарозы 1,7%, расстоянием между гребенками не менее 6 см. Количество продукта амплификации, вносимого в лунку – 5 мкл. В **каждом** ряду дорожек геля должен обязательно присутствовать **положительный контроль (К+)** и **маркер молекулярных масс ДНК**. Оптимальная напряженность электрического поля составляет 10 В/см. Продолжительность электрофореза должна быть достаточной для четкого разделения двух амплифицируемых фрагментов.

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учёт результатов ПЦР-исследования проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:

ACE I 422 п.н.

ACE D 133 п.н.

Результаты анализа полиморфизма в гене ACE (см. рис.1)

1. Наличие в дорожке полосы 422 п.н. при отсутствии полосы 133 п.н. соответствует **гомозиготе по инсерции (генотип «ACE I/I»)**: см. рис.1, образцы 9-12.
2. Наличие в дорожке полосы 133 п.н. при отсутствии полосы 422 п.н. соответствует **гомозиготе по делеции (генотип «ACE D/D»)**: см. рис.1, образцы 1-4.
3. Наличие в дорожке двух полос 422 п.н. и 133 п.н. соответствует **гетерозиготе (генотип «ACE I/D»)**: см. рис.1, образцы 5-8.
4. В дорожке, соответствующей **положительному контролю этапа ПЦР (К+)**, должны быть две полосы на уровне 422 п.н. и 133 п.н.: см. рис.1, образец 14.

5. В дорожках, соответствующих отрицательному контролю экстракции (ОК) и отрицательному контролю этапа ПЦР (К-), не должно быть никаких полос: см. рис.1, образцы 13, 15.
6. В дорожках, соответствующих гетерозиготам, допускается наличие слабых дополнительных полос на уровне около 380-400 п.о., соответствующих гетеродимерам: см. рис.1, образцы 5-8, 14.
7. Кроме полос 422 п.н. и 133 п.н. в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль*	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		133 п.н.	422 п.н.
ОК	Выделение (экстракция) РНК	Нет	Нет
К-	ПЦР	Нет	Нет
К+	ПЦР	Есть	Есть

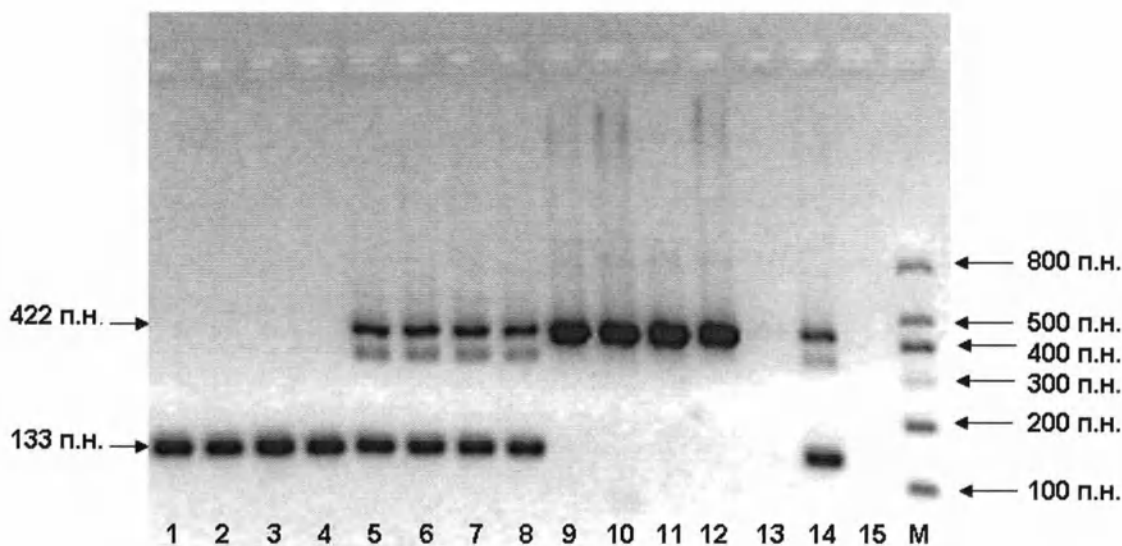
* См. рис.1 образцы 13, 15, 14, соответствующие контролям ОК, К-, К+.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если в дорожке, соответствующей какому-либо клиническому образцу, отсутствуют обе полосы, при прохождении положительного контроля амплификации (К+), результат анализа по данному образцу считается недействительным; необходимо повторить исследование этого клинического образца с первого этапа анализа (экстракция РНК/ДНК). Возможные причины: ошибка в процедуре обработки клинического материала, приведшая к потере ДНК, или ингибирование ПЦР.
2. Если в дорожке, соответствующей какому-либо клиническому образцу или положительному контролю амплификации (К+), отсутствуют обе полосы (422 и 133 п.н.), и присутствуют неспецифические полосы на разных уровнях, результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этого клинического образца со второго этапа анализа (амплификация). Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.

3. Появление полос 422 и/или 133 п.н. в отрицательном контрольном образце ПЦР (К-) и/или в отрицательном контрольном образце экстракции ДНК (ОК) свидетельствует о контаминации реактивов или проб. Требуется повторить анализ образцов с первого этапа анализа (экстракция РНК/ДНК), а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Рисунок 1 – Примеры результатов анализа полиморфизма в гене *ACE*.



Обозначения: 1-4 – гомозиготы по делеции в гене *ACE* (генотип «*ACE D/D*»), 5-8 – гетерозиготы по делеции в гене *ACE* (генотип «*ACE I/D*»), 9-12 – гомозиготы по инсерции в гене *ACE* (генотип «*ACE I/I*»), 13 – отрицательный контроль экстракции, 14 – положительный контроль ПЦР, 15 – отрицательный контроль ПЦР, М – маркер молекулярных масс.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ACE-I/D-EPH» направлять на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ 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)².

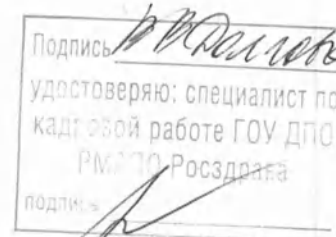
Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»



Д.М.Н. В.В.Долгов



² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 12 лист 06

Зам. директора

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

В.В.Малеев

