

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

Павлов А.Е.

«14» 06 2021 г.



Инструкция по применению

Набор реагентов «**PREP&SEQ™ U-TARGET IL LIBRARY KIT**»

для создания библиотек ампликонов для
последующего таргетного высокопроизводительного секвенирования

ТУ 20.59.52-003-39429653-2020

Каталожный номер

UTK-IL-96-1

UTK-IL-96-2

UTK-IL-96-3

UTK-IL-96-4

Символы

	Обратитесь к инструкции
	Изготовитель
	Код партии
	Номер по каталогу
	Использовать до
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Для IN VITRO диагностики

РЕВИЗИИ ИНСТРУКЦИИ

№ документа	Дата	Примечания к ревизии
UM_L-38ru	15.01.2021	Первичный выпуск

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕВИЗИИ ИНСТРУКЦИИ	3
1. ВВЕДЕНИЕ	5
1.1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
1.2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	5
1.3. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ	7
1.4. ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
1.5. СОВМЕСТИМЫЕ ПАНЕЛИ ПРАЙМЕРОВ	8
1.6. СОСТАВ СИСТЕМЫ МОДУЛЕЙ	8
1.7. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ.....	12
1.8. ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ	13
1.9. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	14
1.10. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИКИ РАБОТЫ.....	15
2. ПРОТОКОЛ	18
2.1 ПРИНЦИП РАБОТЫ	18
2.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК.....	19
2.5. РАЗВЕДЕНИЕ И ПУЛИРОВАНИЕ	28
3. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ	29
4. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА.....	30
5. КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	30

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Prep&Seq™ U-target IL library kit» предназначен для создания баркодированных библиотек ампликонов из образцов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенных из цельной крови, буккального эпителия или сухих пятен крови, обогащенных методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием урацил-содержащих панелей праймеров, с целью последующего высокопроизводительного секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina Inc.) (ПУ №РЗН 2014/1568 от 29.04.2014) для получения информации о последовательности нуклеотидов целевых участков генома.

1.2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Функциональным назначением исследования, выполняемого с помощью Набора реагентов, является проведение таргетной пробоподготовки с использованием урацил-содержащих праймеров (приготовление баркодированных ДНК-библиотек) для последующего анализа биологических образцов, выполняемой при проведении клинической лабораторной диагностики инфекционных патологий, наследственных и онкологических заболеваний с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования на секвенаторах производства Illumina Inc.

Набор реагентов предназначен для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Исследования с использованием Набора реагентов могут проводиться в клиничко-диагностических и научно-исследовательских лабораториях, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот и высокопроизводительное секвенирование на генетических секвенаторах нового поколения.

Набор реагентов предназначен только для профессионального применения. Исследования с использованием Набора реагентов могут выполнять специалисты с высшим медицинским, биологическим или биотехнологическим образованием: биолог, молекулярный биолог, биотехнолог, инженер-технолог, медицинский лабораторный техник, лаборант, врач клинической лабораторной диагностики.

Персонал, проводящий исследования с использованием Набора реагентов, должен владеть навыками проведения молекулярно-биологических исследований и работы на генетических секвенаторах производства Illumina Inc.

Набор реагентов предназначен для обследования людей любого возраста, а также всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

Формат определения – качественный.

Показания и противопоказания к применению отсутствуют.

Тип анализируемого образца: Тип анализируемого образца: геномная ДНК человека, выделенная из цельной крови (капиллярной или венозной), буккального эпителия или сухих пятен крови.

Измерение концентрации рекомендуется проводить спектрофотометрически с использованием анализатора «Varioskan Flash» (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме Поглощения (Absorbance), РУ №РЗН 2014/1842 от 08.08.2014 г.

Взятие, предобработку и хранение биоматериала проводят в соответствии с методическим пособием «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанным ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

При выделении ДНК из цельной крови рекомендуется использовать комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), РУ № ФСР 2009/05220 от 18.05.2017 г.

При выделении ДНК из буккального эпителия и сухих пятен крови рекомендуется использовать набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала на основе спиртового осаждения «Экстра-ДНК-Био» (ООО «Алкор Био», Россия), РУ № ФСР 2012/13631 от 29.06.2012 г.

Для сбора буккального эпителия рекомендуется использовать щетки 4N6FLOQSwabs Regular («Copan Flock Technologies srl», Италия), РУ № ФСЗ 2012/13327 от 04.12.2012 г. Для хранения и транспортировки образцов буккального эпителия использовать транспортный раствор (АО «Вектор-Бест», Россия), РУ № РЗН 2017/6004 от 24.07.2017 г.

Урациловые панели праймеров для применения с Набором реагентов должны иметь в составе не менее 1 урацила, иметь концентрацию 0,1-0,4 пмоль/мкл, обеспечивать амплификацию фрагментов ДНК длиной не более 375 п.н., содержать не более 4000 праймеров в одном пуле, содержать не более 2 пулов праймеров.

Набор реагентов состоит из отдельных компонентов, каждый из которых позволяет провести соответствующую стадию пробоподготовки образца.

Допускается возможность дробного использования и повторных заморозок-разморозок отдельных компонентов Набора реагентов не более 10 раз.

1.3. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор реагентов Prep&Seq™ U-target IL library kit предназначен для обогащения целевых участков ДНК методом мультиплексной ПЦР с использованием урацил-содержащих панелей праймеров и создания библиотек ампликонов, анализируемых методом высокопроизводительного секвенирования.

На первом этапе проводится реакция таргетного обогащения методом мультиплексной ПЦР с использованием урацил-содержащих праймеров. Ампликоны, полученные в ходе мультиплексной ПЦР, подвергаются ферментативной модификации концов с отрезанием праймеров по урацилу, после чего к ним лигируются универсальные адаптерные последовательности для секвенаторов производства Illumina Inc. После лигирования осуществляется ПЦР, в ходе которой происходит обогащение библиотеки и молекулярное баркодирование образцов. После баркодирующей ПЦР осуществляется очистка готовой библиотеки с помощью магнитных частицы.

Контрольный образец (КО), входящий в состав Набора реагентов, представляет собой однопультную панель урацил-содержащих праймеров, предназначенную для контроля постановки и концентрации финальных библиотек.

Рекомендуется включать Контрольный образец (КО) в первую постановку с Набором реагентов при использовании кастомной панели урацил-содержащих праймеров.

1.4. ХАРАКТЕРИСТИКИ

- **Предел обнаружения** набора реагентов составляет 2 нг ДНК на вход. Диапазон рабочих концентраций 0,33-10 нг/мкл.
- Концентрации готовых библиотек: >1500 нг/мл.
- Размеры ампликонов контрольной библиотеки: 75 п.н. - 375 п.н.
- Количество уникально баркодированных образцов: до 96 (с каждым из вариантов исполнения).
- Максимальное количество ампликонов в пуле: до 4000.
- **Диагностические характеристики** набора реагентов «Prep&Seq™ U-target IL library kit» определяются совместно используемым набором для таргетного обогащения и качественного определения клинически значимых генетических вариантов.

1.5. СОВМЕСТИМЫЕ ПАНЕЛИ ПРАЙМЕРОВ

Для этапа таргетного обогащения необходимы **одно- или двухпультные** урацил-содержащие панели праймеров (например, AmpliSeq™, Thermo Fisher Scientific, США; урациловые панели ООО «ПАРСЕК ЛАБ») **до 4000 пар праймеров** в одном пуле, в концентрации **400 нМ**.

1.6. СОСТАВ СИСТЕМЫ МОДУЛЕЙ

Изделие выпускается в 4 вариантах исполнения со следующими каталожными номерами:

- **УТК-IL-96-1.** Содержимого достаточно для подготовки 96 библиотек ДНК. Набор баркодов 96-1.
- **УТК-IL-96-2.** Содержимого достаточно для подготовки 96 библиотек ДНК. Набор баркодов 96-2.
- **УТК-IL-96-3.** Содержимого достаточно для подготовки 96 библиотек ДНК. Набор баркодов 96-3.
- **УТК-IL-96-4.** Содержимого достаточно для подготовки 96 библиотек ДНК. Набор баркодов 96-4.

В состав изделия с каталожным номером **УТК-IL-96-1** (содержимого достаточно для подготовки 96 библиотек ДНК; Набор баркодов 96-1) входят следующие компоненты:

№ п/п	Комплекты и их компоненты	Количество	Объем
1. Комплект для приготовления библиотек		1 комплект	
1.1	ПЦР смесь 1 (ПС1)	1 пробирка	450 мкл
1.2	Смесь для восстановления (СВ)	1 пробирка	230 мкл
1.3	Буфер для лигирования (БЛ)	1 пробирка	440 мкл
1.4	Лигаза (Л)	1 пробирка	230 мкл
1.5	Адаптер (А)	1 пробирка	230 мкл
1.6	ПЦР смесь 2 (ПС2)	3 пробирки	1800 мкл
1.7	Контрольный образец (КО)	1 пробирка	20 мкл
2. Комплект для молекулярного баркодирования А-Н		1 комплект	
2.1	Баркод А (А)	1 пробирка	30 мкл
2.2	Баркод В (В)	1 пробирка	30 мкл
2.3	Баркод С (С)	1 пробирка	30 мкл
2.4	Баркод D (D)	1 пробирка	30 мкл
2.5	Баркод Е (Е)	1 пробирка	30 мкл
2.6	Баркод F (F)	1 пробирка	30 мкл
2.7	Баркод G (G)	1 пробирка	30 мкл
2.8	Баркод H (H)	1 пробирка	30 мкл

3. Комплект для молекулярного баркодирования 1-12		1 комплект	
3.1	Баркод 1 (1)	1 пробирка	20 мкл
3.2	Баркод 2 (2)	1 пробирка	20 мкл
3.3	Баркод 3 (3)	1 пробирка	20 мкл
3.4	Баркод 4 (4)	1 пробирка	20 мкл
3.5	Баркод 5 (5)	1 пробирка	20 мкл
3.6	Баркод 6 (6)	1 пробирка	20 мкл
3.7	Баркод 7 (7)	1 пробирка	20 мкл
3.8	Баркод 8 (8)	1 пробирка	20 мкл
3.9	Баркод 9 (9)	1 пробирка	20 мкл
3.10	Баркод 10 (10)	1 пробирка	20 мкл
3.11	Баркод 11 (11)	1 пробирка	20 мкл
3.12	Баркод 12 (12)	1 пробирка	20 мкл
4. Комплект для очистки		1 комплект	
4.1	Магнитные частицы (М)	4 пробирки	4800 мкл

В состав изделия с каталожным номером **UTK-IL-96-2** (содержимого достаточно для подготовки 96 библиотек ДНК; Набор баркодов 96-2) входят следующие компоненты:

№ п/п	Комплекты и их компоненты	Количество	Объем
1. Комплект для приготовления библиотек		1 комплект	
1.1	ПЦР смесь 1 (ПС1)	1 пробирка	450 мкл
1.2	Смесь для восстановления (СВ)	1 пробирка	230 мкл
1.3	Буфер для лигирования (БЛ)	1 пробирка	440 мкл
1.4	Лигаза (Л)	1 пробирка	230 мкл
1.5	Адаптер (А)	1 пробирка	230 мкл
1.6	ПЦР смесь 2 (ПС2)	3 пробирки	1800 мкл
1.8	Контрольный образец (КО)	1 пробирка	20 мкл
2. Комплект для молекулярного баркодирования I-P		1 комплект	
2.1	Баркод I (I)	1 пробирка	30 мкл
2.2	Баркод J (J)	1 пробирка	30 мкл
2.3	Баркод K (K)	1 пробирка	30 мкл
2.4	Баркод L (L)	1 пробирка	30 мкл
2.5	Баркод M (M)	1 пробирка	30 мкл
2.6	Баркод N (N)	1 пробирка	30 мкл
2.7	Баркод O (O)	1 пробирка	30 мкл
2.8	Баркод P (P)	1 пробирка	30 мкл
3. Комплект для молекулярного баркодирования 1-12		1 комплект	

3.1	Баркод 1 (1)	1 пробирка	20 мкл
3.2	Баркод 2 (2)	1 пробирка	20 мкл
3.3	Баркод 3 (3)	1 пробирка	20 мкл
3.4	Баркод 4 (4)	1 пробирка	20 мкл
3.5	Баркод 5 (5)	1 пробирка	20 мкл
3.6	Баркод 6 (6)	1 пробирка	20 мкл
3.7	Баркод 7 (7)	1 пробирка	20 мкл
3.8	Баркод 8 (8)	1 пробирка	20 мкл
3.9	Баркод 9 (9)	1 пробирка	20 мкл
3.10	Баркод 10 (10)	1 пробирка	20 мкл
3.11	Баркод 11 (11)	1 пробирка	20 мкл
3.12	Баркод 12 (12)	1 пробирка	20 мкл
4. Комплект для очистки		1 комплект	
4.1	Магнитные частицы (M)	4 пробирки	4800 мкл

В состав изделия с каталожным номером **UTK-IL-96-3** (содержимого достаточно для подготовки 96 библиотек ДНК; Набор баркодов 96-3) входят следующие компоненты.

№ п/п	Комплекты и их компоненты	Количество	Объем
1. Комплект для приготовления библиотек		1 комплект	
1.1	ПЦР смесь 1 (ПС1)	1 пробирка	450 мкл
1.2	Смесь для восстановления (СВ)	1 пробирка	230 мкл
1.3	Буфер для лигирования (БЛ)	1 пробирка	440 мкл
1.4	Лигаза (Л)	1 пробирка	230 мкл
1.5	Адаптер (А)	1 пробирка	230 мкл
1.6	ПЦР смесь 2 (ПС2)	3 пробирки	1800 мкл
1.7	Контрольный образец (КО)	1 пробирка	20 мкл
2. Комплект для молекулярного баркодирования SA-SH		1 комплект	
2.1	Баркод SA (SA)	1 пробирка	30 мкл
2.2	Баркод SB (SB)	1 пробирка	30 мкл
2.3	Баркод SC (SC)	1 пробирка	30 мкл
2.4	Баркод SD (SD)	1 пробирка	30 мкл
2.5	Баркод SE (SE)	1 пробирка	30 мкл
2.6	Баркод SF (SF)	1 пробирка	30 мкл
2.7	Баркод SG (SG)	1 пробирка	30 мкл
2.8	Баркод SH (SH)	1 пробирка	30 мкл
3. Комплект для молекулярного баркодирования S1-S12		1 комплект	
3.1	Баркод S1 (S1)	1 пробирка	20 мкл
3.2	Баркод S2 (S2)	1 пробирка	20 мкл

3.3	Баркод S3 (S3)	1 пробирка	20 мкл
3.4	Баркод S4 (S4)	1 пробирка	20 мкл
3.5	Баркод S5 (S5)	1 пробирка	20 мкл
3.6	Баркод S6 (S6)	1 пробирка	20 мкл
3.7	Баркод S7 (S7)	1 пробирка	20 мкл
3.8	Баркод S8 (S8)	1 пробирка	20 мкл
3.9	Баркод S9 (S9)	1 пробирка	20 мкл
3.10	Баркод S10 (S10)	1 пробирка	20 мкл
3.11	Баркод S11 (S11)	1 пробирка	20 мкл
3.12	Баркод S12 (S12)	1 пробирка	20 мкл
4. Комплект для очистки		1 комплект	
4.1	Магнитные частицы (M)	4 пробирки	4800 мкл

В состав изделия с каталожным номером **UTK-IL-96-4** (содержимого достаточно для подготовки 96 библиотек ДНК; Набор баркодов 96-4) входят следующие компоненты.

№ п/п	Комплекты и их компоненты	Количество	Объем
1. Комплект для приготовления библиотек		1 комплект	
1.1	ПЦР смесь 1 (ПС1)	1 пробирка	450 мкл
1.2	Смесь для восстановления (СВ)	1 пробирка	230 мкл
1.3	Буфер для лигирования (БЛ)	1 пробирка	440 мкл
1.4	Лигаза (Л)	1 пробирка	230 мкл
1.5	Адаптер (А)	1 пробирка	230 мкл
1.6	ПЦР смесь 2 (ПС2)	3 пробирки	1800 мкл
1.7	Контрольный образец (КО)	1 пробирка	20 мкл
2. Комплект для молекулярного баркодирования SI-SP		1 комплект	
2.1	Баркод SI (SI)	1 пробирка	30 мкл
2.2	Баркод SJ (SJ)	1 пробирка	30 мкл
2.3	Баркод SK (SK)	1 пробирка	30 мкл
2.4	Баркод SL (SL)	1 пробирка	30 мкл
2.5	Баркод SM (SM)	1 пробирка	30 мкл
2.6	Баркод SN (SN)	1 пробирка	30 мкл
2.7	Баркод SO (SO)	1 пробирка	30 мкл
2.8	Баркод SP (SP)	1 пробирка	30 мкл
3. Комплект для молекулярного баркодирования S1-S12		1 комплект	
3.1	Баркод S1 (S1)	1 пробирка	20 мкл
3.2	Баркод S2 (S2)	1 пробирка	20 мкл
3.3	Баркод S3 (S3)	1 пробирка	20 мкл
3.4	Баркод S4 (S4)	1 пробирка	20 мкл
3.5	Баркод S5 (S5)	1 пробирка	20 мкл

3.6	Баркод S6 (S6)	1 пробирка	20 мкл
3.7	Баркод S7 (S7)	1 пробирка	20 мкл
3.8	Баркод S8 (S8)	1 пробирка	20 мкл
3.9	Баркод S9 (S9)	1 пробирка	20 мкл
3.10	Баркод S10 (S10)	1 пробирка	20 мкл
3.11	Баркод S11 (S11)	1 пробирка	20 мкл
3.12	Баркод S12 (S12)	1 пробирка	20 мкл
4. Комплект для очистки		1 комплект	
4.1	Магнитные частицы (M)	4 пробирки	4800 мкл

1.7. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Описание	Поставщик	Каталожный номер	РУ
ПЦР-бокс (ламинар или рабочее место)	Lamsystems	-	РУ ФСР 2010/07113 от 18.03.2010
Система очистки воды Milli-Q	Millipore	Z00QSV0WW	РУ №ПЗН2013/26 5
ПЦР-амплификатор (Veriti™, SimpliAmp™)	Thermo Fisher Scientific	4375786 A24811	РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 РУ № ПЗН 2019/9341 от 06.12.2019
Оптические 96-луночные планшеты для ПЦР MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates	Thermo Fisher Scientific	N8010560	РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017
Пленки для 96-луночных планшетов MicroAmp® Clear Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	4306311	
Пробирки 0,2 мл для ПЦР	SSI	SSI-3220-00	РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5—10 мкл; на 2-20 мкл, на 10—100 мкл; на 20—200 мкл; на 100—1000 мкл	Eppendorf	-	РУ ФСЗ 2011/11028
Наконечники с фильтром в штативах для дозаторов объемом до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл	SSI	-	РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017

Центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин	любой	-	-
Анализатор иммунологический «Varioskan Flash»	Thermo Fisher Scientific	N06354	ПУ № РЗН 2014/1842 от 08.08.2014
Панель урацил-содержащих праймеров	любой	-	-
Магнитный штатив	Thermo Fisher Scientific	12331D	-
Пробирки LoBind™ объемом 1,5 мл	Eppendorf	022431021	ПУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009
Пробирки LoBind™ объемом 2 мл	Eppendorf	022431048	
Пробирки типа Falcon 50 мл	Eppendorf	0030122178	
Этанол, медицинский	любой	-	-
Перчатки неопудренные	любые	-	-

1.8. ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ

Аналитом для Набора реагентов является геномная ДНК человека, выделенная из клеток цельной крови (венозной или капиллярной), буккального эпителия или сухих пятен крови. Для подготовки библиотек подходит как свежевыделенная ДНК, так и замороженная или частично деградированная ДНК.

Взятие, предобработку и хранение биоматериала проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и согласно пользовательской инструкции набора для экстракции ДНК.

Рекомендуется использование образцов крови, собранных в пробирки, покрытые микрокаплями антикоагулянта ЭДТА К2 (2-замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) или ЭДТА К3 (3-замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). ЭДТА предотвращает свертывание крови путем связывания ионов кальция и не влияет на гематологические параметры.

При работе с биологическими образцами обязательно использовать индивидуальные средства защиты, в том числе перчатки, непромокаемые халаты, средства защиты лица и глаз (маски, очки, экраны).

При выделении ДНК из цельной крови рекомендуется использовать комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия), ПУ №ФСР 2009/05220 от 18.05.2017 г.

При выделении ДНК из буккального эпителия или сухих пятен крови рекомендуется использовать набор реагентов для выделения ДНК из клинического

материала на основе спиртового осаждения «Экстра-ДНК-Био» (ООО «Алкор Био», Россия), РУ №ФСР 2012/13631 от 29.06.2012 г.

Для сбора, хранения и транспортировки сухих пятен крови рекомендуется использовать ДНК-Карты (ООО «Алкор Био», Россия), РУ №РЗН 2016/4615 от 23.08.2016 г.

Для сбора буккального эпителия рекомендуется использовать щетки 4N6FLOQSwabs Regular («Copan Flock Technologies», Италия), РУ №ФСЗ 2012/13327 от 04.12.2012 г. Для хранения и транспортировки образцов буккального эпителия использовать транспортный раствор (АО «Вектор-Бест», Россия), РУ №РЗН 2017/6004 от 24.07.2017 г.

Измерение концентрации рекомендуется проводить спектрофотометрически с использованием анализатора «Varioskan Flash» (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме Поглощения (Absorbance), РУ №РЗН 2014/1842 от 08.08.2014 г.

Для проведения реакции мультиплексной таргетной амплификации рекомендуется брать 1-10 нг ДНК (**от количества входной ДНК зависит количество циклов ПЦР таргетного обогащения – см. Раздел 2.3**). Минимально допустимая концентрация – 0,33 нг/мкл.

При отсутствии ограничений в источнике ДНК рекомендуется использовать 10 нг материала.

Количество пулов в панели	Количество входной гДНК	Минимально допустимая концентрация входной гДНК	Объем входной гДНК
2 пула	1 нг	0,33 нг/мкл	3 мкл
	10 нг	3,3 нг/мкл	3 мкл
1 пул	1 нг	0,16 нг/мкл	6 мкл
	10 нг	1,66 нг/мкл	6 мкл

1.9. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Потенциальный риск применения Системы модулей – класс 2Б (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г).
- При работе с Системой модулей следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». СП 1.3.2333-08

«Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Не использовать компоненты Системы модулей после истечения срока их годности.
- Во избежание контаминации ДНК необходимо пространственное разделение этапов пре- и пост-ПЦР: отдельные помещения, отдельные халаты, отдельные пипетки и другие лабораторные материалы.
- Персонал, проводящий исследования, должен проводить работы в защитной одежде – лабораторные халаты, средства индивидуальной защиты.
- Перед началом работы с любыми компонентами внимательно ознакомиться с документами по безопасности, предоставленными производителями, а также актуальными инструкциями по их использованию.
- При работе с образцами биоматериала необходимо руководствоваться МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и соблюдать санитарно-эпидемические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

1.10. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИКИ РАБОТЫ

Необходимо соблюдать МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Рекомендации по контролю контаминации

- Во избежание контаминации ДНК настоятельно рекомендуется пространственное разделение пре- и пост-ПЦР зон.
- Всегда проводите работу в лабораторной одежде: халат с длинным рукавом и манжетами, одноразовые неопудренные перчатки.
- Приготовление всех рабочих смесей, в том числе смесей для ПЦР, должно проводиться с использованием наконечников с фильтрами.

- Всегда меняйте наконечник между разными образцами и баркодами.
- **Контаминация баркодов между собой недопустима.**
- Протирайте рабочие поверхности до начала и после завершения работы деконтаминирующими средствами.
- Проводите регулярные деконтаминационные мероприятия для предупреждения загрязнения стоков реагентов и образцов.

Рекомендации по работе с протоколом

- Перед каждым этапом работы необходимо заблаговременно размораживать только необходимые для протокола реагенты и перемешивать их вортексированием.
- Вортексирование должно проводиться на настольном вортексе/центрифуге с разной интенсивностью для разных типов реагентов. Образцы ДНК, баркоды, и буферные растворы должны перемешиваться не менее 10 секунд с высокой интенсивностью. **Смеси ферментов должны перемешиваться с осторожностью:** 1—2 секунды на вортексе с низкой интенсивностью.
- После перемешивания все реагенты необходимо центрифугировать в импульсном режиме (1—2 секунды) для сбрасывания капель со стенок и крышек пробирок.

Рекомендации по работе с магнитными частицами

- Перед использованием необходимо выдержать магнитные частицы при комнатной температуре не менее 30 минут.
- Перед использованием необходимо тщательно вортексировать магнитные частицы 15—30 секунд до гомогенизации раствора.
- При раскапывании необходимо свести к минимуму потери объема магнитных частиц и строго соблюдать количество добавляемых частиц, указанное в протоколе. Необходимо следить за гомогенностью раствора и не допускать осаждения частиц.
- Инкубируйте раствор с частицами при комнатной температуре в течение минимум 5 минут.
- При промывке частиц спиртовым раствором **важно не снимать** 96-луночный планшет или пробирки с магнитного штатива. Отбирайте супернатант медленно во избежание размывания частиц по пробирке, не задевая осадок из частиц.
- Всегда готовьте **свежий 70% спирт**. Использование старого спиртового раствора может привести к потере ДНК.

- Во время удаления спирта **важно полностью отобрать остаточные капли спирта**. Используйте дозатор 0,5—10 мкл для окончательно отбора спирта из реакции. Спирт ингибирует последующие этапы пробоподготовки.
- При просушке осадка из частиц **важно не снимать** 96-луночный планшет или пробирки с магнитного штатива во избежание утери частиц за счет действия электростатических сил.
- Использование многоканальной полуавтоматической пипетки на этапе промывки спиртовым раствором может помочь в экономии времени и трудозатрат.
- При элюции ДНК с частиц тщательно перемешивайте раствор.

2. ПРОТОКОЛ

2.1 ПРИНЦИП РАБОТЫ

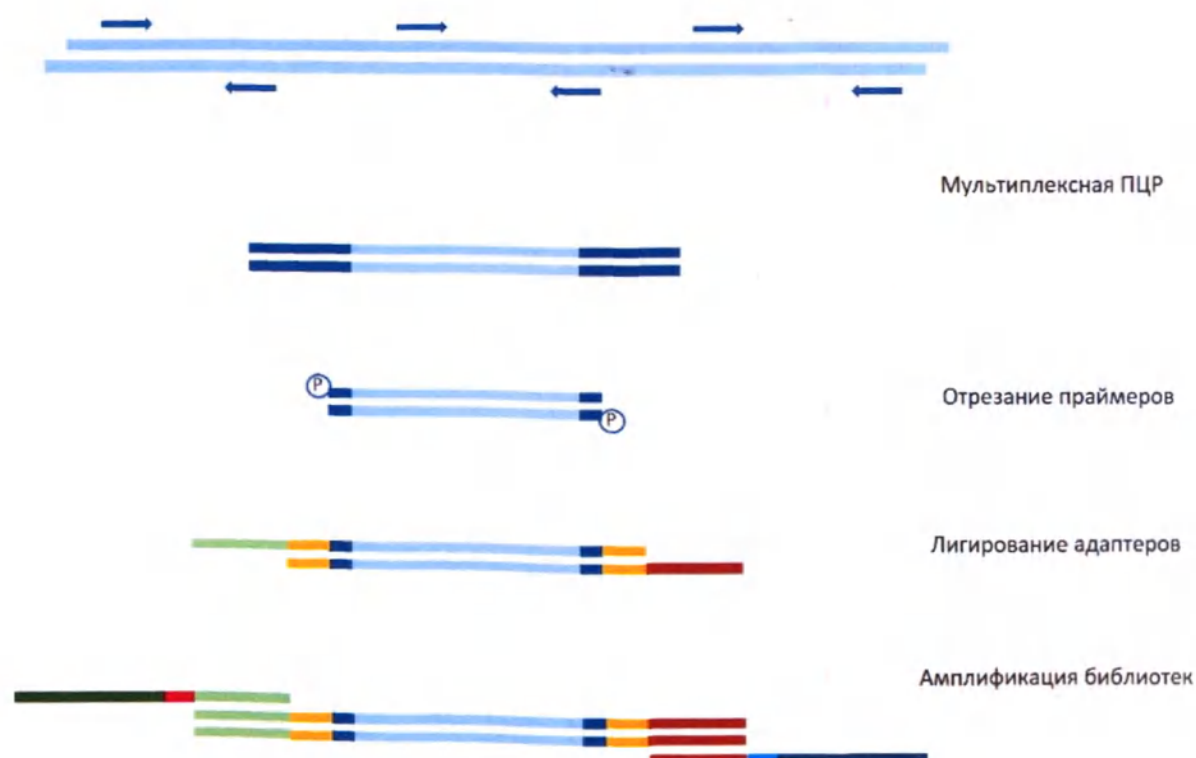
1) Постановка мультиплексной ПЦР для амплификации целевых участков ДНК с использованием специализированной панели урацил-содержащих праймеров. Для панели, содержащей несколько пулов праймеров, реакция амплификации выполняется отдельно для каждого пула праймеров.

2) Отрезание последовательностей праймеров ПЦР продуктов и восстановление концов.

3) Лигирование адаптеров, специфичных для платформы для секвенирования. Очистка библиотек на магнитных частицах.

4) Амплификация библиотек с баркодированием. Очистка библиотек на магнитных частицах.

Схема протокола



2.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК

Процесс создания библиотек включает следующие основные этапы: таргетное обогащение геномной ДНК с использованием урацил-содержащих панелей праймеров, отрезание праймеров с восстановлением концов, лигирование адаптерных последовательностей, амплификация библиотек с баркодированием.

Таргетное обогащение ДНК

Рекомендуется включать в постановку КО, особенно при первой постановке с используемой панелью праймеров.

Перед началом работы:

- Достаньте **панель урацил-содержащих праймеров** из морозильной камеры и выдержите на комнатной температуре 20 мин. Убедитесь, что реагенты полностью разморожены. После размораживания перемешайте содержимое каждой пробирки на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
- Достаньте **ПЦР смесь 1 (ПС1)** из морозильной камеры, тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
- Разморозьте КО перед постановкой. Тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
- Выдержите **исследуемые образцы ДНК** при комнатной температуре. Тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.

Для 1-пульных панелей праймеров:

1. Для проведения ПЦР (таргетного обогащения геномной ДНК) приготовьте рабочую смесь на необходимое количество реакций.

Рабочая смесь

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
ПС1	4
Пул праймеров	10

Рекомендуется готовить общий мастер-микс на всю постановку.

Подготовьте смесь с КО.

Смесь с КО

Компонент	Объем, мкл
ПС1	4
КО	10

- Тщательно перемешайте смеси на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме. Перенесите по 14 мкл **Рабочей смеси** в новые 0,2 мл пробирки или лунки 96-луночного планшета и добавьте ≤ 6 мкл исследуемого образца ДНК в каждую пробирку или лунку (добавьте воду I типа при необходимости):

Компонент	Объем, мкл
Мастер-микс	14
Геномная ДНК 1-10 нг	≤ 6
Вода I типа	до 20

- Перемешайте реакции на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
- Внесите в **Смесь с КО** образец ДНК (рекомендуется использовать один из образцов из постановки) в объеме ≤ 6 мкл. При необходимости доведите объем каждой реакции до 20 мкл водой I типа. Перемешайте реакции на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
- Поместите реакции в амплификатор с программой таргетного обогащения (см. ниже). **Внимание:** смесь с КО запускать по программе таргетного обогащения для КО (см. ниже).

Для 2-пульных панелей праймеров:

- Приготовьте две рабочие смеси «Пул 1» и «Пул 2» объемом 7 мкл – по одной для каждого пула праймеров, исходя из необходимого количества реакций из расчета на 1 пул праймеров:

Компонент	Объем, мкл
ПС1	2
Пул праймеров 1 или 2	5

Рекомендуется готовить общие мастер-миксы для нескольких образцов.

- Тщательно перемешайте мастер-микс на вортексе и центрифугируйте в импульсном режиме. Перенесите по 7 мкл мастер-микса в новые 0,2 мл пробирки или лунки 96-луночного планшета и добавьте ≤ 3 мкл исследуемого образца ДНК в каждую пробирку или лунку (добавьте воду I типа при необходимости):

Компонент	Объем, мкл
Мастер-микс	7
Геномная ДНК 1-10 нг	≤ 3
Вода I типа	до 10

- Перемешайте реакции на вортексе, центрифугируйте в импульсном режиме.
- При работе с 2-пульными панелями **Смесь с КО** необходимо подготовить согласно таблицам выше по протоколу 1-пульных панелей и включить их в постановку.
- Поместите реакции в амплификатор с программой таргетного обогащения.

Программа таргетного обогащения

Количество циклов	Температура	Время
1	95°C	15 мин
Установите число циклов в соответствии с используемой панелью праймеров и количеством ДНК*	99°C	15 сек
	60°C	4 мин/8 мин*
1	4°C	Хранение ¹

* Определите количество циклов и время элонгации по таблице:

Количество ампликонов на пул праймеров	Для 10 нг ДНК	Для 1 нг ДНК	Время элонгации
12-24	21	24	4 мин

¹ Ампликоны могут храниться 12 ч при +4°C. Для более длительного хранения поместите ампликоны на -20°C и храните до 1 месяца.

25-48	20	23	4 мин
49-96	19	22	4 мин
97-192	18	21	4 мин
193-384	17	20	4 мин
385-768	16	19	4 мин
769-1536	15	18	4 мин
1537-3072	14	17	8 мин
3073-4000	13	16	8 мин

Программа таргетного обогащения для КО

Количество циклов	Температура	Время
1	95°C	15 мин
18	99°C	15 сек
	60°C	4 мин
1	4°C	Хранение

Отрезание праймеров с восстановлением концов

- При работе с панелями, состоящими из 2 пулов праймеров, объедините реакции «Пул 1» и «Пул 2» для каждого образца до финального объема 20 мкл. При работе с панелями из 1 пула праймеров перейдите к п.2.
- Добавьте 2 мкл Смеси для восстановления (СВ) к 20 мкл ПЦР-продукта:

Компонент	Объем, мкл
ПЦР-продукт	20
СВ	2
Итого	22

- Тщательно вортексируйте смеси, центрифугируйте в импульсном режиме и поместите в амплификатор с заданной программой:

Температура	Время
50°C	10 мин
55°C	10 мин
60°C	20 мин
10°C	Хранение (не более 1 часа)

Лигирование адаптеров

Перед началом работы:

- Достаньте **Буфер для лигирования (БЛ)** и **Адаптер (А)**. Выдержите при комнатной температуре с учетом полной разморозки.
- Достаньте **Лигазу (Л)** из морозильной камеры, коротко вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель. Оставьте лигазу на -20°C перед внесением.

1. Добавьте следующие компоненты к ПЦР-продукту после отрезания праймеров:

Компонент	Объем, мкл
ПЦР-продукт с отрезанными праймерами	22
БЛ	4
А	2
Л	2
Итого	30

Примечание: не готовьте микс, содержащий Лигазу (Л) и адаптеры во избежание формирования димеров адаптеров. Добавляйте Лигазу (Л) в самом конце.

2. Тщательно вортексируйте реакции, центрифугируйте в импульсном режиме и поместите в амплификатор с заданной программой:

Температура	Время
22°C	30 мин

72°C	10 мин
10°C	Хранение (не более 1 часа) ²

Очистка продуктов лигирования

Перед началом работы:

- Достаньте Магнитные частицы (**M**) из холодильной камеры и выдержите при комнатной температуре 30 мин. Тщательно вортексируйте частицы в течение 15-30 сек перед использованием.
- Приготовьте свежий 70 % спирт из расчета 300 мкл на образец.
- Достаньте мастер-микс для обогащения библиотек **ПЦР смесь 2 (ПС2)** из морозильной камеры и выдержите при комнатной температуре до полной разморозки. Тщательно вортексируйте реагент и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.
- Подготовьте нужное количество баркодов из Комплектов для молекулярного баркодирования. **Внимание: в каждую реакцию вносится по 2 мкл баркода A-P/SA-SP и по 2 мкл баркода 1-12/S1-S12.** Выдержите реагенты при комнатной температуре до полного размораживания. Тщательно вортексируйте и центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель.

1. Приготовьте **разведение** магнитных частиц (M) водой 1 типа исходя из расчета на 1 образец.

Компонент	Объем, мкл
Вода I типа	20
Магнитные частицы (M)	22
Итого	42

2. Добавьте 42 мкл тщательно перемешанных **разведенных частиц** к 30 мкл лигированной библиотеки. Тщательно вортексируйте до гомогенного состояния и центрифугируйте в импульсном режиме.

² Для более длительного хранения поместите образцы на -20°C.

3. Инкубируйте образцы 5 минут при комнатной температуре.
4. По истечении времени инкубации поместите образцы на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
5. Не снимая образцы с магнитного штатива, аккуратно перенесите супернатант в новую пробирку, не задевая осадка магнитных частиц. Утилизируйте осадок магнитных частиц.

Примечание: целевые ампликоны находятся в супернатанте. Сохраните супернатант!

6. Добавьте 58 мкл частиц магнитных частиц (M) (**неразбавленных**) к супернатанту. Тщательно перемешайте содержимое на вортексе до гомогенного состояния и центрифугируйте в импульсном режиме.
7. Инкубируйте образцы 5 минут при комнатной температуре.
8. По истечении времени инкубации поместите образцы на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
9. Не снимая образцы с магнитного штатива, удалите супернатант, не задевая осадок магнитных частиц.

Примечание: целевые ампликоны находятся на магнитных частицах. Сохраните осадок магнитных частиц!

10. Добавьте 150 мкл свежеприготовленного 70% спирта к осадку магнитных частиц. Удалите весь спирт, не задевая осадок магнитных частиц.
11. Повторите пункт 10 для повторной промывки осадка.
12. После удаления спирта снимите образцы с магнитного штатива и центрифугируйте в импульсном режиме. Верните пробирки на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта. Подсушите осадок 5 минут на магнитном штативе. Не пересушивайте осадок.
13. Приступите к приготовлению ПЦР мастер-микса для амплификации библиотек, пока осадок сушится.

Амплификация библиотек

1. В каждую пробирку с сухим осадком частиц внесите 48 мкл **ПЦР смеси 2 (ПС2)**.
2. Внесите в каждую пробирку по 2 мкл пары баркодов с учетом непересечения пар внутри одной постановки.

Примечание: в реакцию вносится 2 мкл прямого праймера (A-H / I-P / SA-SH / SI-SP и 2 мкл обратного праймера (1-12 / S1-S12).

3. Тщательно вортексируйте реакции, центрифугируйте в импульсном режиме для сброса капель и поместите в амплификатор с заданной программой:

Примечание: сохраняйте частицы в реакции, ПЦР проводится в присутствии частиц.

Количество циклов	Температура	Время
1	98°C	2 мин
5	98°C	15 сек
	64°C	1 мин
1	4°C	Хранение ³

Очистка библиотек после обогащения

Перед началом работы:

- Достаньте **Магнитные частицы (М)** из холодильной камеры и выдержите при комнатной температуре 30 мин. Тщательно вортексируйте частицы в течение 15-30 сек перед использованием.
- Приготовьте свежий 70% спирт из расчета 300 мкл на образец.

1. Добавьте 85 мкл магнитных частиц к амплифицированной библиотеке. Тщательно перемешайте содержимое на вортексе до гомогенного состояния и центрифугируйте в импульсном режиме.
2. Инкубируйте образцы 5 минут при комнатной температуре.
3. По истечении времени инкубации поместите образцы на магнитный штатив, оставьте на 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.

³Продукты могут храниться до 1 суток при +4°C. Не допускается замораживание ПЦР-продукта, несущего магнитные частицы.

4. Не снимая образцы с магнитного штатива, удалите супернатант, не задевая осадок магнитных частиц.

Примечание: целевые ампликоны находятся на магнитных частицах. Сохраните осадок магнитных частиц!

5. Добавьте 150 мкл свежеприготовленного 70% спирта к осадку магнитных частиц. Удалите весь спирт, не задевая осадок магнитных частиц.
6. Повторите пункт 5 для повторной промывки осадка.
7. После удаления спирта снимите образцы с магнитного штатива и центрифугируйте в импульсном режиме. Верните пробирки на магнитный штатив и удалите остаточные капли спирта. Подсушите осадок 5 минут на магнитном штативе. **Не пересушивайте осадок.**
8. Добавьте к каждому образцу 35 мкл воды I типа.
9. Тщательно перемешайте содержимое на вортексе до гомогенного состояния и центрифугируйте в импульсном режиме.
10. Поместите образцы на магнитный штатив и инкубируйте 5 минут или до полного восстановления прозрачности раствора.
11. Перенесите супернатант, содержащий **очищенные обогащенные библиотеки**⁴ в чистые пробирки.

Количественная оценка библиотек

Количественная оценка библиотек выполняется с помощью анализатора «Varioskan Flash» (Thermo Fisher Scientific). Измеряется поглощение на длине волны 260 нм (A₂₆₀), после чего производится расчет концентрации по формуле:

$$c = A_{260} * f$$

где

c = концентрация в нг/мл;

A = поглощение на длине волны 260 нм (см⁻¹);

f = 50нг-см/мкл (фактор для dsDNA).

Концентрации библиотек зависят от используемой панели праймеров и могут варьировать в диапазоне 1500 – 30000 нг/мл.

⁴Библиотеки могут храниться при +4°C в течение недели и при -20°C в течение 6 месяцев.

2.5. РАЗВЕДЕНИЕ И ПУЛИРОВАНИЕ

Во время данного этапа библиотеки разводятся водой I типа до оптимальной концентрации и пулируются для последующего высокопроизводительного секвенирования.

Внимание:

Оптимальная концентрация для пулирования библиотек, подготовленных для платформы **Illumina**, составляет **4000 pM**, что соответствует следующим концентрациям библиотек:

- 800-1000 нг/мл для ампликонов длиной до 275 п.н.
- 1100-1500 нг/мл для ампликонов длиной до 375 п.н.

После первой постановки с панелью финальные концентрации можно варьировать для получения оптимальной плотности кластеров.

Разведение и пулирование библиотек одной панели праймеров

1. Проведите расчет разведения библиотек до оптимальной концентрации, исходя из размера ампликонов.
2. Осуществите разведение и пулирование, объединяя по 5-10 мкл готовых библиотек. Используйте пробирки DNA LoBind.
3. Тщательно вортексируйте готовый пул и центрифугируйте в импульсном режиме.

Разведение и пулирование библиотек разных панелей праймеров

В случае одновременного секвенирования панелей X1, X2, X3...Xi.

1. Разведите каждую библиотеку до концентрации 4000 pM (Illumina).
2. Для каждой панели умножьте общее количество ампликонов панели (N_amplicons_panel_Xi) на количество образцов, секвенируемых с данной панелью (N_samples_panel_Xi) по формуле:

$$\text{Summa_PanelXi} = (\text{N_amplicons_panel_Xi} * \text{N_samples_panel_Xi})$$

3. Найдите общее количество ампликонов во всех образцах и всех панелях, которые будут секвенироваться в запуске прибора по формуле:

$$\text{Summa_total} = \text{Summa_PanelX1} + \text{Summa_PanelX2} + \text{Summa_PanelX3} + \dots + \text{Summa_PanelXi}$$

4. Выберите финальный объем смеси библиотек - V_mix. Объем может быть произвольным в зависимости от количества библиотек.
5. Для каждой библиотеки рассчитайте объем, который необходимо внести в общую смесь библиотек

$$\text{V_libr_X} = \text{V_mix} * \text{N_amplicons_panel_Xi} / \text{Summa_total}$$

Пример расчета приведен ниже:

При комбинации библиотек рекомендуется оперировать объемами не менее 5 мкл. Оперирование малыми объемами (1 мкл и менее) может привести к существенным ошибкам пипетирования при комбинации объемов библиотек и, соответственно, к неравномерности покрытия библиотек.

Панель	Сумма ампликонов всех пулов панели (N_amplicons_panel_Xi)	Количество образцов	Summa_panelXi	Summa_total	V_mix	V librX
1	50	4	200	5000	500 мкл	5 мкл
2	100	8	800			10 мкл
3	200	20	4000			20 мкл

3. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

- Транспортировку Набора реагентов производить крытыми видами транспорта при температуре от плюс 2 до плюс 8°C.
- Допускается транспортировка с использованием термоконтейнера и хладоэлементов не более 3 суток. Транспортирование изделий должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы.
- Реагенты, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.
- Компоненты Набора реагентов должны храниться в упаковке предприятия-изготовителя в морозильных и холодильных камерах (в соответствии с температурным режимом хранения, указанным на этикетке) при обозначенной температуре в течение всего срока годности.
- Наборы, хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.
- После вскрытия компоненты Набора реагентов хранятся в течение всего срока годности.
- Срок годности Набора реагентов 9 месяцев⁵.

⁵Стабильность изделия подтверждена данными исследования стабильности в режиме реального времени.

4. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

- Гарантийный срок годности 9 месяцев со дня приемки изделия отделом технологического контроля.
- Рекламации могут быть направлены в письменном виде на почтовый адрес производителя либо по электронной почте.

5. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

- При утилизации отходов необходимо руководствоваться требованиями СанПин 2.1.3684-21.
- Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.
- После истечения срока годности пробирки с реагентами и картонные пачки утилизируются как отходы класса А (эпидемиологически безопасные).

6. КОНТАКТЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

**ООО «ПАРСЕК ЛАБ»**

Parseq Lab Co. Ltd.

ИНН 7816584473, ОГРН 1147847123797

Почтовый и фактический адрес:

197350, Россия, г. Санкт-Петербург, дорога в Каменку, д. 74, лит. А,
помещение 1-Н, комната 347 (K711) 348 (K708)E-mail: info@parseq.pro

Телефон: +7 812 243 1190

Web-сайт: www.parseq.ru

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 30
(тридцать) листа (ов).

Должность, ФИО Ген. директор
Гаврилов А. Е.

(подпись)

« 08 » сентября 2021 г.

