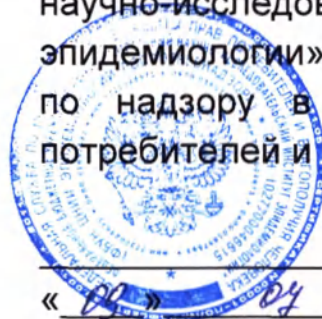


«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин

« 04 » 04 20 24 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для детекции генетического полиморфизма (ТА)5/6/7/8 (rs8175347) в гене UGT1A1 методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа серии PyroMark

(профиль генетического исследования «Синдром Жильбера»)

«АмплиСенс® Пироскрин UGT1A1-скрин»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК	13
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	13
СОСТАВ	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	14
АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	15
Б. Проведение амплификации	16
ПРОБОПОДГОТОВКА ПЦР-ПРОДУКТА И ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЕ	16
Прибор PyroMark Q24	16
А. Программирование прибора PyroMark Q24	16
Б. Подготовка картриджа	17
В. Подготовка планшета для пиросеквенирования	18
Г. Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию	18
Г1. Иммунизация ПЦР-продукта	18
Г2. Очистка ПЦР-продукта с использованием вакуумной станции.	19
Д. Пиросеквенирование ПЦР-продукта	21
Прибор PyroMark Q96 MD	22
А. Программирование прибора PyroMark Q96 MD	22
Б. Подготовка картриджа	24
В. Подготовка планшета для пиросеквенирования	24
Г. Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию	24
Г1. Иммунизация ПЦР-продукта	25
Г2. Очистка ПЦР-продукта с использованием вакуумной станции.	26
Д. Пиросеквенирование ПЦР-продукта	28
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	29
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	37
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	38
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	39

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
МУ	– методические указания
ИФА	– иммуноферментный анализ
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
СанПиН	– санитарные правила и нормы
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
SNP	– single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
rs	– reference SNP (идентификационный номер полиморфного ДНК локуса в международных базах данных SNP)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® Пироскрин UGT1A1-скрин» предназначен для определения генетического полиморфизма (ТА)5/6/7/8 (rs8175347) в гене UGT1A1, геномной ДНК человека, экстрагированной из биологического материала (цельная кровь) с использованием метода пиросеквенирования. Набор реагентов может быть применен в медицинской практике для диагностики синдрома Жильбера и для фармакогенетического тестирования (например, при назначении иринотекана и других препаратов, для которых рекомендовано определение полиморфизма rs8175347, а также в целях расширенного фармакогенетического обследования).

ВНИМАНИЕ! В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Детекция генетических полиморфизмов с помощью метода пиросеквенирования включает в себя четыре этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, амплификацию участка ДНК исследуемого генетического

локуса, процедуру пробоподготовки и постановку реакции пиросеквенирования.

После экстракции ДНК проводится амплификация исследуемого генетического локуса со специфическими праймерами. Для последующей иммобилизации продукта амплификации, содержащего изучаемый полиморфный участок ДНК, и проведения пробоподготовки используется праймер, связанный с биотином. В зависимости от направления секвенирования возможны два типа анализа: прямой анализ (forward analysis) и обратный анализ (reverse analysis). В первом случае биотинилирован обратный праймер для амплификации, во втором – прямой праймер для амплификации.

После проведения ПЦР продукт амплификации связывается с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином, для последующей очистки реакционной смеси и получения одноцепочечного фрагмента ДНК путем проведения серии отмывок с помощью станции для пробоподготовки Vacuum Prep Workstation. Для связывания ампликона используется реагент Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare). После очистки и иммобилизации одноцепочечного ПЦР-продукта проводится определение нуклеотидной последовательности исследуемого генетического локуса в реакции пиросеквенирующего синтеза.

Пиросеквенирующий синтез (пиросеквенирование) – метод определения нуклеотидной последовательности ДНК в режиме «реального времени», основанный на детекции высвобождающегося пирофосфата при элонгации цепи ДНК в ходе синтеза второй цепи ДНК на матрице одноцепочечной ДНК (реакции секвенирующего синтеза). Высвобождающийся пирофосфат проходит серию ферментативных превращений, в результате чего регистрируется хемилюминесцентный сигнал; совокупность сигналов соответствует нуклеотидной последовательности исследуемого генетического локуса.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант 50 F

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК и постановки реакции пиросеквенирования. Для проведения полного исследования необходимо использовать комплекты

реагентов для экстракции ДНК и комплект для пробоподготовки, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций пиросеквенирования.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность

Таблица 1

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК ¹	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность ² , копий/мл
Цельная кровь	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант 50 F	1x10 ⁵

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на панели контрольных образцов с известными генотипами, определенными методом секвенирования по Сэнгеру с использованием секвенатора 3500xL Genetic Analyzer PRO. Последовательности секвенированных фрагментов, полученных с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин UGT1A1-скрин» и с использованием референтного метода сравнивали между собой и с референтной нуклеотидной последовательностью гена UGT1A1 (ref|NC_000002.12|, основания 233760153-233760282). При проведении тестирования неспецифических реакций и неправильного определения генотипов выявлено не было, аналитическая специфичность составила 100%.

Воспроизводимость и повторяемость

Воспроизводимость и повторяемость анализа были определены на панели контрольных образцов с известными генотипами. Панель включала по 8 повторов каждого образца, тестирование проводили дважды в разные дни. Для определения воспроизводимости анализа учитывали

¹ Комплект для экстракции ДНК не входит в состав набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин UGT1A1-скрин».

² Количество копий геномной ДНК человека в 1 мл образца исследуемого материала.

определение генотипа в повторях. Генотип был правильно определен во всех экспериментах.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность набора реагентов определяли на 200 образцах геномной ДНК человека. В качестве референсного метода была использована методика секвенирования по Сэнгеру с использованием секвенатора 3500xL Genetic Analyzer PRO. Генотип образцов и нуклеотидную последовательность исследуемого генетического локуса удалось определить в 100% случаев. В соответствии с полученными данными **диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность** набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин UGT1A1-скрин» (относительная чувствительность и специфичность в сравнении с использованным методом сравнения) составляет 99-100 % с доверительной вероятностью 90 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одnorазового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ВНИМАНИЕ! Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается перемещение персонала из помещения для секвенирования в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для секвенирования.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и

хранения набора риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Пробирки вакуумные для взятия, хранения и транспортировки проб крови для лабораторных исследований *in vitro* (например, Green Vac-Tube, Standard Plus & Medical Co., Ltd. («Стандарт Плюс & Медикал Ко., Лтд.»), Корея).
2. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований *in vitro* (например, Green-Vac[®], Shina Corporation («Шина Корпорейшн»), Корея).

Предварительная подготовка исследуемого материала

3. Гемолитик (РУ № ФСР 2010/09505) – реагент для предобработки цельной крови.

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
8. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
9. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
10. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
13. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

14. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие, рекомендованные Изготовителем.
15. Реагент ТЕ-буфер, пробирка 5 мл (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).
16. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК.

Амплификация ДНК.

17. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл с плоской крышкой (в зависимости от модели используемого амплификатора) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
18. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или

плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого амплификатора, например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

19. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
20. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
21. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
22. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
23. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
24. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
25. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
26. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
27. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
28. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), MaxyGene Gradient (Axugen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
29. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
30. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
31. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Пробоподготовка ПЦР-продукта и пиросеквенирование

32. Реагент H_2O стерильная (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).
33. Комплект для пробоподготовки «ПИРО-преп» (форма комплектации 1 набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин» (РУ № ФСР 2012/13246) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).
34. Набор реагентов PyroMark Gold Q24 Reagents или PyroMark Gold Q96 Reagents (QIAGEN GmbH («КИАГЕН ГмбХ»), Германия), (РУ № ФСЗ 2011/08860).
35. Частицы сефарозы Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, США).
36. Парафильм (например, Pechiney Plastic Packaging, США).
37. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
38. Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 5 мл или 10 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
39. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
40. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
41. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
42. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
43. Микропланшеты для пиросеквенирования PyroMark (QIAGEN GmbH («КИАГЕН ГмбХ»), Германия).
44. Картридж для прибора PyroMark Q24 или диспенсоры для пиросеквенирования на приборе PyroMark Q96 MD (QIAGEN GmbH («КИАГЕН ГмбХ»), Германия).
45. Фильтры для вакуумной станции для пробоподготовки PyroMark (QIAGEN GmbH («КИАГЕН ГмбХ»), Германия).
46. Ванночки для вакуумной станции PyroMark (QIAGEN GmbH («КИАГЕН ГмбХ»), Германия).

47. Термопланшет для пробоподготовки образцов для прибора PyroMark Q24 или термопланшет с алюминиевым прессом для пробоподготовки образцов для прибора PyroMark Q96 MD (QIAGEN GmbH («КИАГЕН ГмбХ»), Германия).
48. Планшет полистироловый для иммуноферментного анализа (например, ОАО «Фирма Медполимер», Россия).
49. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
50. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
51. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
52. Вакуумная станция для пробоподготовки PyroMark (QIAGEN GmbH («КИАГЕН ГмбХ»), Германия).
53. Прибор для определения нуклеотидной последовательности методом пиросеквенирования PyroMark Q24 или PyroMark Q96 MD (QIAGEN GmbH («КИАГЕН ГмбХ»), Германия, или аналогичный).
54. Шейкер для 96-луночных планшетов Titramax 1000 (Heidolph, Германия).
55. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
56. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
57. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Интерпретация результатов пиросеквенирования

58. Компьютер с установленной операционной системой Microsoft® Windows XP™(RUS) и выше.
59. Флеш-карта.
60. Программное обеспечение к прибору PyroMark Gold Q24 Reagents или PyroMark Gold Q96 Reagents для анализа полученных результатов.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для проведения исследования служит цельная кровь.

Цельная кровь

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в

пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется и экстракция ДНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

Образцы цельной крови требуют предварительной подготовки. В пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл внести 1,0 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,1 мл крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 4 тыс. g (например, 8 тыс. об/мин для микроцентрифуги MiniSpin) 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 немедленно лизирован (в случае экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем экстрагировать ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту, не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для проведения исследования не использовать для взятия крови пробирки, содержащие гепарин.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант 50 F – комплект реагентов для проведения реакции амплификации и пиросеквенирования – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь UA1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,275	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
2,5х ПЦР-буфер blue	Прозрачная жидкость синего цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
Праймер UA1-S	Прозрачная бесцветная жидкость	0,33	5 пробирок
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(проводится в зоне Экстракции – помещении для экстракции нуклеиновых кислот)

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» и другие, рекомендованные Изготовителем. Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-преп» смотрите в инструкции к используемому комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Объем исследуемого образца – **100 мкл.**

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО.**

Объем элюции – **50 мкл.**

АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК

(проводится в зоне Амплификации – помещении для проведения амплификации)

Выбор пробирок для проведения ПЦР зависит от используемого амплификатора.

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

Перед проведением ПЦР следует определить концентрацию ДНК в полученных образцах и при

необходимости развести выделенную ДНК ТЕ-буфером до рабочей концентрации 10-30 нг в реакцию (соответствует концентрации выделенной ДНК 3×10^5 – 9×10^5 копий/мл) (для приготовления разведений рекомендуется использовать реагент ТЕ-буфер, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. Для проведения N реакций необходимо $5 \cdot (N+1)$ мкл ПЦР-смеси UA1, $10 \cdot (N+1)$ мкл 2,5x ПЦР-буфера blue и $0,5 \cdot (N+1)$ мкл полимеразы (TaqF).
2. Перемешать на вортексе содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной стерильной пробирке смешать необходимое количество ПЦР-смеси UA1, 2,5x ПЦР-буфера blue и полимеразы (TaqF). Тщательно перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь хранить не более 2 ч.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов
5. Внести в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.
6. Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл) (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
7. Промаркировать пробирки.
8. Подготовить пробирки с экстрагированной ДНК, предназначенной для проведения исследования. В случае хранения пробирок их необходимо встряхнуть на вортексе, а затем центрифугировать при 10 тыс g в течение 30 сек.
9. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб ДНК** в концентрации 1-3 нг/мкл, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, используя отдельный наконечник с фильтром для каждой пробы.
10. Поставить контрольную реакцию:
отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с

реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 2).
2. Запустить выполнение программы амплификации. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

Примечание – Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

Таблица 2

Программа амплификации

Для амплификаторов группы 1 ⁴				Для амплификаторов группы 2 ⁵		
Цикл	Температура, °С	Время	Циклы	Температура, °С	Время	Циклы
0	95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45	95	15 с	45
	60	10 с		60	15 с	
	72	15 с		72	20 с	
3	72	2 мин	1	72	2 мин	1
4	10	Хранение		10	Хранение	

3. После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и приступить к подготовке продуктов амплификации к пиросеквенированию.

ПРОБОПОДГОТОВКА ПЦР-ПРОДУКТА И ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЕ

Прибор PyroMark Q24

А. Программирование прибора PyroMark Q24

1. Включить прибор.

ВНИМАНИЕ! Перед запуском необходимо прогреть прибор в течение 60 мин.

2. Запустить программное обеспечение PyroMark Q24 v2.0.6.

3. Приступить к настройке тестов:

а) в меню **File** выбрать вкладку **New Assay**, в ней выбрать вкладку **AQ Assay**;

⁴ Например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁵ Например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Group of The Applera Corporation), MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.) и другие, рекомендованные Изготовителем.

- в строку **Dispensation Order** (порядок добавления нуклеотидов) ввести нуклеотидную последовательность⁶, при этом строка **Sequence to Analyze** (последовательность для анализа) должна оставаться незаполненной;
 - б) в меню **File** выбрать вкладку **Save as**, задать название теста, сохранить тест и закрыть окно настройки тестов.
4. Подготовка анализа – создание шаблона эксперимента:
- а) в меню **File** выбрать вкладку **New Run**;
 - в меню **Instrument Method** выбрать **PyroMark Q24 Method 001 Rev. A(1)_1**;
 - в окне **Plate Setup** для каждой исследуемой ячейки в верхней строке нажатием правой кнопки мыши с помощью опции **Load Assay** ввести тесты для исследуемых образцов;
 - в окне **Plate Setup** во второй и третьей строке нажатием левой кнопки мыши задать параметры исследуемых образцов (названия, примечания);
 - б) в меню **File** выбрать вкладку **Save As**, задать название анализа, сохранить шаблон эксперимента на электронном носителе (флеш-карте) и закрыть окно настройки тестов.
5. В меню **Tools** подготовленного шаблона эксперимента выбрать **Pre Run Information**. В появившемся окне будет указано количество реактивов, необходимое для проведения анализа. Переписать или распечатать эту информацию для проведения подготовки картриджа.

Б. Подготовка картриджа

ВНИМАНИЕ! Все действия следует осуществлять согласно «Руководству по эксплуатации реагентов PyroMark Gold Q24 Reagents» или «Руководству по эксплуатации реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents».

1. Растворить лиофилизированные смеси **ферментов** и **субстратов** в **H₂O** **стерильной** в соответствии с руководством по эксплуатации реагентов PyroMark Gold Q24 Reagents или PyroMark Gold Q96 Reagents.

⁶ Нуклеотидные последовательности указаны в разделе «Интерпретация результатов» в табл. 5 и примечаниях к ней.

2. Внести в соответствующие ячейки картриджа рассчитанное программным обеспечением для данного эксперимента количество смеси ферментов («Е»), субстрата («S») и нуклеотидов («А», «Т», «С», «G»);
3. Открыть крышку прибора, поднять крышку фиксирующую картридж, вставить картридж в прибор и закрепить положение картриджа фиксатором».

ВНИМАНИЕ! Растворенные смеси ферментов и субстратов хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Нуклеотиды не замораживать, хранить при температуре хранения от 2 до 8 °С.

В. Подготовка планшета для пиросеквенирования

1. Перемешать на вортексе праймер UA1-S, осадить капли на вортексе;
2. В соответствии с шаблоном эксперимента, в анализируемые ячейки планшета для секвенирования внести по 25 мкл праймера UA1-S;
3. Закрыть планшет для секвенирования парафильмом.

ВНИМАНИЕ! Необходимо убедиться, что порядок ячеек в планшете для секвенирования соответствует заданному шаблону эксперимента.

Г. Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы частицы сефарозы, набор для пробоподготовки «ПИРО-преп» и H₂O стерильную прогреть при температуре от 22 до 25 °С.

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы приготовить на H₂O стерильной однократный денатурирующий раствор и однократный отмывочный буфер из соответствующих 10-кратных стоковых растворов.

Г1. Иммуобилизация ПЦР-продукта

1. Аккуратно встряхнуть бутылку с сефарозными частицами до получения однородной взвеси.
2. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 – 2 мл смесь для иммобилизации продукта ПЦР. На один анализируемый образец требуется:
 - а) частицы сефарозы – 2 мкл;
 - б) связывающий буфер – 40 мкл;
 - в) H₂O стерильная – 28 мкл.

Определить по схеме приготовления (таблица 3) количество каждого реагента, требующееся для приготовления смеси. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас на одну реакцию.

Таблица 3

Схема приготовления смеси для иммобилизации

Количество проб (N+1)	Объем реагентов на указанное количество проб, мкл		
	Частицы сефарозы	Связывающий буфер	H ₂ O стерильная
7	14	280	196
9	18	360	252
11	22	440	308
13	26	520	364
15	30	600	420
17	34	680	476
19	38	760	532
25	50	1000	700

ВНИМАНИЕ! Перед использованием приготовленную смесь тщательно перемешать и осадить капли на вортексе.

3. В планшет для ИФА в каждую анализируемую ячейку внести по 10 мкл ПЦР-продукта, затем добавить 70 мкл смеси для иммобилизации.

ВНИМАНИЕ! В процессе работы анализируемые образцы в ячейках планшета для ИФА должны быть сориентированы так же, как и в планшете для секвенирования.

4. Закрыть весь планшет парафильмом.

ВНИМАНИЕ! Все ячейки планшета должны быть закрыты для предотвращения попадания ПЦР-продукта в соседние ячейки в процессе инкубации на шейкере.

5. Поместить планшет на шейкер и инкубировать в течение 10 мин при 1350-1400 об/мин.

Г2. Очистка ПЦР-продукта с использованием вакуумной станции.

1. Подготовка вакуумной станции:

а) заполнить пять ванночек следующим образом:

- примерно 40-50 мл раствора для очистки;
- примерно 40-50 мл однократного денатурирующего раствора;
- примерно 40-50 мл однократного отмывочного буфера;

- примерно 40-50 мл H_2O стерильная;
 - примерно 70 мл H_2O стерильная.
- б) включить вакуумный насос, после образования вакуума открыть вакуумный переключатель (**On**);
 - в) промыть зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночке с 70 мл H_2O стерильной и убедиться, что вода потекла в контейнер для сброса и инактивации материалов;
 - г) поднять устройство вакуумной пробоподготовки, поддержать под углом больше 90° в течение 2-3 с и убедиться, что зонды фильтра сухие;
 - д) перекрыть вакуумный переключатель (**Off**) и поставить устройство вакуумной пробоподготовки в позицию **Parking**.

2. Пробоподготовка образцов:

- а) снять *планшет* для ИФА с образцами с шейкера, осторожно опустить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в планшет;
- б) поставить переключатель устройства вакуумной пробоподготовки в положение **On**, полностью отобрать ПЦР-продукт и смесь для иммобилизации из *планшета* для ИФА;

ВНИМАНИЕ! Частицы сефарозы быстро осаждаются, поэтому процедуру необходимо провести в течение одной минуты и убедиться, что вся жидкость отобрана из ячеек и частицы сефарозы собраны на фильтрах.

- в) аккуратно поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **раствором для очистки** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- г) поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **однократным денатурирующим раствором** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- д) поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **однократным отмывочным буфером** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- е) поднять устройство вакуумной пробоподготовки и поддержать фильтры вертикально в течение 2-3 с;

- ж) держа устройство вакуумной пробоподготовки над планшетом для пиросеквенирования выключить вакуумный переключатель (**Off**);
 - з) опустить фильтры на дно ячеек и аккуратно встряхнуть устройство вакуумной пробоподготовки из стороны в сторону несколько раз, так, чтобы частицы сефарозы с зондов оказались в ячейках планшета для пиросеквенирования;
 - и) промыть фильтры в ванночке, содержащей 40-50 мл воды **H₂O стерильной**, в течение 5-10 с;
 - к) поместить фильтры в ванночку, содержащую 70 мл воды **H₂O стерильной**, включить вакуумный переключатель (**On**) и промыть фильтры в течение 10 с;
 - л) поднять устройство вакуумной пробоподготовки и поддержать фильтры вертикально в течение 5 с;
 - м) установить инструмент в позицию **Parking**, выключить вакуумный насос, подождать несколько минут и перекрыть вакуумный переключатель (**Off**).
3. Отжиг праймеров на одноцепочечной ДНК:
- а) поставить планшет для пиросеквенирования с образцами на предварительно разогретый до 80 °С термопланшет, установленный на термостате, и инкубировать в течение 2 мин;
 - б) снять планшет и дать ему остыть при температуре от 18 до 25 °С в течение 5 мин.

Д. Пиросеквенирование ПЦР-продукта

1. Запуск прибора PyroMark Q24:

- а) поднять фиксатор для планшета, поместить планшет для секвенирования в прибор, опустить фиксатор, закрыть прибор;
- б) вставить в прибор флеш-карту с шаблоном эксперимента;
- в) на панели прибора выбрать в главном меню **Run** и нажать **OK**;
- г) открыть в окне прибора заданный шаблон эксперимента и нажать **Select**, подтвердить выбор шаблона эксперимента (**Yes**);

- д) после завершения реакции вынуть флеш-карту и приступить к обработке результатов анализа на компьютере.
2. Обработка результатов анализа:
- а) запустить программное обеспечение PyroMark Q24;
 - б) в меню **File** выбрать вкладку **Open** и открыть файл с результатами анализа;
 - в) проанализировать результаты секвенирования нажатием кнопки **Analyze All Wells**;
 - г) в меню **Reports** выбрать опцию **SNP Analysis Results**, посмотреть или сохранить результаты анализа нажатием кнопок **Preview** или **Save**, соответственно.

Прибор PyroMark Q96 MD

А. Программирование прибора PyroMark Q96 MD

1. Включить прибор.

ВНИМАНИЕ! Перед запуском необходимо прогреть прибор в течение 90 мин.

2. Запустить программное обеспечение PyroMark MD 1.0.

3. Приступить к настройке тестов:

- а) в главном меню выбрать **SNP**, затем вкладку **Simplex Entries**, нажатием правой кнопкой мыши выбрать пункт **New Entry**;
 - в строку Entry ID ввести название теста;
 - в строку **Dispensation Order** (порядок добавления нуклеотидов) ввести нуклеотидную последовательность⁷, при этом строка **Sequence to Analyze** (последовательность для анализа) должна оставаться незаполненной.
- б) сохранить тест, нажав **Save**, и закрыть окно настройки тестов.

4. Подготовка анализа – создание шаблона эксперимента:

Секвенирование одного планшета:

- а) в главном меню выбрать **SNP Runs**, в открывшемся окне нажатием правой кнопкой мыши в папке **SNP Runs** выбрать пункт **New SNP Run**;

⁷ Используемые нуклеотидные последовательности указаны в разделе «Интерпретация результатов» в табл. 5 и примечаниях к ней.

- б) в открывшемся окне задать название и параметры эксперимента;
- в) в строке **Instrument Parameters** выбрать **Instrument Parameters MD 0003CDT**;
- г) в окне **Active Wells** с помощью мыши выбрать ячейки, в которых находятся исследуемые образцы, и нажать кнопку **Activate**;
- д) выбрать вкладку **Setup**, затем **Entry**, нажать кнопку **Simplex**, в строке **Entry** выбрать нужный тест и с помощью «карандаша» отметить ячейки с исследуемыми образцами;
- е) во вкладках **Sample ID** и **Notes** задать названия и примечания для исследуемых образцов;
- ж) выбрать вкладку **General**, нажать **View**, выбрать **Run**;
- з) в появившемся окне будет указано количество реактивов, необходимое для проведения анализа, переписать или распечатать эту информацию для проведения подготовки картриджа;
- и) нажать **Save** и закрыть окно.

Секвенирование нескольких планшетов («пакетный» запуск):

- а) повторить процедуру создания шаблона эксперимента для каждого планшета в отдельности (см. пункт 4а);
- б) в главном меню выбрать **Batch**, в открывшемся окне нажатием правой кнопкой мыши в опции **Batch** выбрать пункт **New Batch**;
- в) выбрать вкладку **Setup**, задать название и параметры эксперимента;
- г) в главном меню нажать **SNP Runs** и перенести с помощью мыши каждый созданный шаблон в окно **Run Name**;
- д) установить функции **Use Barcode** и **Analyze SNP**;
- е) нажать **Save**;
- ж) в меню **Batch** выбрать **Setup Information**;
- з) в появившемся окне будет указано количество реактивов, необходимое для проведения анализа; переписать или распечатать эту информацию для проведения подготовки картриджа;
- и) нажать **Save** и закрыть окно.

Б. Подготовка картриджа

ВНИМАНИЕ! Все действия следует осуществлять согласно «Руководству по эксплуатации реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents».

1. Растворить лиофилизированные смеси **ферментов** и **субстратов** в **H₂O** **стерильной** в соответствии с руководством к набору **PyroMark Gold Q96 Reagents**;
2. Внести в соответствующие ячейки картриджа рассчитанное программным обеспечением для данного эксперимента количество смеси ферментов («Е»), субстрата («S») и нуклеотидов («А», «Т», «С», «G»);
3. Открыть крышку прибора, поднять крышку фиксирующую картридж, вставить картридж в прибор и закрепить положение картриджа фиксатором».

ВНИМАНИЕ! При работе с картриджем необходимо предварительно вставить в него наконечники, отведя в стороны фиксаторы.

ВНИМАНИЕ! Растворенные смеси ферментов и субстратов хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Нуклеотиды не замораживать, хранить при температуре от 2 до 8 °С.

В. Подготовка планшета для пиросеквенирования

1. Перемешать на вортексе праймер UA1-S, осадить капли на вортексе;
2. В соответствии с шаблоном эксперимента, в анализируемые ячейки планшета для секвенирования раскапать по 12 мкл праймера UA1-S;
3. Закрыть планшет для секвенирования парафильмом.

ВНИМАНИЕ! Необходимо убедиться, что порядок ячеек в планшете для секвенирования соответствует заданному шаблону эксперимента.

Г. Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы частицы сефарозы, набор для пробоподготовки «ПИРО-преп» и **H₂O** **стерильную** прогреть при температуре от 22 до 25 °С.

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы приготовить на **H₂O** **стерильной** однократный денатурирующий раствор и однократный отмывочный буфер из соответствующих 10-кратных стоковых растворов.

Г1. Иммуобилизация ПЦР-продукта

1. Аккуратно встряхнуть бутылку с сефарозными частицами до получения однородной взвеси;
2. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5–10 мл смесь для иммобилизации продукта ПЦР. На 1 анализируемый образец требуется:
 - а) частицы сефарозы – 2 мкл;
 - б) связывающий буфер – 40 мкл;
 - в) H_2O стерильная – 28 мкл.

Определить по схеме приготовления (таблица 4) количество каждого реагента, требующегося для приготовления смеси. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас на одну реакцию

Таблица 4

Схема приготовления смеси для иммобилизации

Количество проб (N+1)	Объем реагентов на указанное количество проб, мкл		
	Частицы сефарозы	Связывающий буфер	H_2O стерильная
7	14	280	196
9	18	360	252
11	22	440	308
13	26	520	364
15	30	600	420
17	34	680	476
19	38	760	532
25	50	1000	700
33	66	1320	924
41	82	1640	1148
49	98	1960	1372
57	114	2280	1596
65	130	2600	1820
73	146	2920	2044
81	162	3240	2268
89	178	3560	2492
97	194	3880	2716

ВНИМАНИЕ! Перед использованием приготовленную смесь тщательно перемешать на вортексе. При приготовлении смеси на большое количество образцов, во время работы смесь надо периодически встряхивать на вортексе, чтобы избежать оседания сефарозы.

3. В планшет для ИФА в каждую анализируемую ячейку внести по 10 мкл ПЦР-продукта, затем добавить 70 мкл смеси для иммобилизации;

ВНИМАНИЕ! В процессе работы анализируемые образцы в ячейках планшета для ИФА должны быть сориентированы так же, как и в планшете для пиросеквенирования.

4. Закрыть весь планшет парафильмом;

ВНИМАНИЕ! Все ячейки планшета должны быть закрыты для предотвращения попадания ПЦР-продукта в соседние ячейки в процессе инкубации на шейкере.

5. Поместить планшет на шейкер и инкубировать в течение 10 мин при 1350-1400 об/мин.

Г2. Очистка ПЦР-продукта с использованием вакуумной станции.

1. Подготовка вакуумной станции:

- а) заполнить четыре ванночки следующим образом:

- примерно 40-50 мл раствора для очистки;
- примерно 40-50 мл однократного денатурирующего раствора;
- примерно 40-50 мл однократного отмывочного буфера;
- примерно 70 мл H_2O стерильная.

- б) включить вакуумный насос, после образования вакуума открыть вакуумный переключатель (**On**);

- в) промыть зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночке с 70 мл H_2O стерильной и убедиться, что вода потекла в контейнер для сброса и инактивации материалов;

- г) поднять устройство вакуумной пробоподготовки, поддержать под углом больше 90° в течение 2-3 с и убедиться, что зонды фильтра сухие;

- д) перекрыть вакуумный переключатель (**Off**) и поставить устройство вакуумной пробоподготовки в позицию **Parking**.

2. Пробоподготовка образцов:

- а) снять планшет для ИФА с образцами с шейкера, осторожно опустить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в планшет;

- б) поставить переключатель устройства вакуумной пробоподготовки в положение **On**, полностью отобрать ПЦР-продукт и смесь для иммобилизации из планшета для ИФА;

ВНИМАНИЕ! Частицы сефарозы быстро осаждаются, поэтому процедуру необходимо провести в течение одной минуты и убедиться, что вся жидкость отобрана из ячеек и частицы сефарозы собраны на фильтрах.

- в) аккуратно поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **раствором для очистки** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- г) поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **однократным денатурирующим раствором** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- д) поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **однократным отмывочным буфером** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- е) поднять устройство вакуумной пробоподготовки и поддержать фильтры вертикально в течение 2-3 с;
- ж) держа устройство вакуумной пробоподготовки над планшетом для пиросеквенирования, выключить вакуумный переключатель (**Off**);
- з) опустить фильтры на дно ячеек и аккуратно встряхнуть устройство вакуумной пробоподготовки из стороны в сторону несколько раз, так, чтобы частицы сефарозы с зондов оказались в ячейках планшета для секвенирования;
- и) поместить фильтры в ванночку, содержащую 70 мл **H₂O стерильной**, включить вакуумный переключатель (**On**) и промыть фильтры в течение 10 с;
- к) поднять устройство вакуумной пробоподготовки и поддержать фильтры вертикально в течение 5 с.
- л) установить инструмент в позицию **Parking**, выключить вакуумный насос, подождать несколько минут и перекрыть вакуумный переключатель (**Off**).
3. Отжиг праймеров на одноцепочечной ДНК:
- а) поставить планшет для пиросеквенирования с образцами на предварительно разогретый до 80 °С термопланшет,

установленный на термостате, и инкубировать в течение 2 мин;

ВНИМАНИЕ! Необходимо закрыть планшет сверху парафильмом и алюминиевым прессом, чтобы избежать чрезмерного испарения жидкости из ячеек.

- б) снять планшет и дать ему остыть при температуре от 18 до 25 °С в течение 5 мин.

Д. Пиросеквенирование ПЦР-продукта

1. Запуск прибора PyroMark Q96 MD:

- а) в главном меню программы выбрать **Instrument**, затем **Manage**, появившемся окне **Manage Instruments** нажать **Open** (прибор поднимет крышку, которая фиксирует планшет для секвенирования);
- б) убедиться в проходимости диспенсоров картриджа, для этого:
- поставить в прибор пустой планшет для пиросеквенирования, предварительно закрытый парафильмом, в окне **Manage Instruments**, нажать **Close** и закрыть крышку прибора;
 - в окне **Manage Instruments** нажать **Test**;
 - в окне **Manage Instruments** нажать **Open**, открыть крышку, проанализировать капли на парафильме, капли должны быть расположены в следующем порядке: ячейка **D5** – E, **D8** – S, **E5** – A, **E6** – C, **E7** – G, **E8** – T.

Секвенирование одного планшета:

- а) поставить в прибор планшет с образцами для пиросеквенирования, в окне **Manage Instruments** нажать **Close** и закрыть крышку прибора;
- б) в главном меню выбрать **SNP**, затем **SNP Runs**, в окне **SNP Runs** открыть шаблон эксперимента и нажать **Run**;
- в) после завершения реакции нажать **Close** и приступить к обработке результатов анализа.

Секвенирование нескольких планшетов:

- а) вытащить емкость для планшетов, отвести фиксатор в сторону, вставить планшеты с исследуемыми образцами;
- б) в главном меню выбрать **SNP**, затем **Batch**, в окне **Batch Name** выбрать шаблон эксперимента и нажать **Play**.
- в) после завершения секвенирования нажать **Stop**.

2. Обработка результатов анализа:

- а) запустить программное обеспечение PyroMark MD 1.0;
- б) в главном меню выбрать **SNP**, затем **SNP Runs**, в окне **SNP Runs** открыть файл с результатами анализа;
- в) проанализировать результаты секвенирования нажатием кнопки **All** в меню **Analyze**;
- г) посмотреть результаты анализа для исследованных образцов, выбрав вкладку **Well Info**, или экспортировать данные с помощью опции **Report**.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведение анализа

Анализ аллельного состояния полиморфизма проводится автоматически программным обеспечением прибора. Полученные результаты интерпретируют на основании данных об исследуемом генетическом локусе, представленных в **таблице 5**. При анализе результатов следует учитывать направление секвенирования, указанное в столбце **Анализ** (секвенирование прямой или обратной цепи).

Результатом анализа является определение генотипа по анализируемому генетическому локусу. Варианты определяемого генотипа: гомозигота по частому аллелю, гетерозигота, гомозигота по редкому аллелю (столбец **Варианты генотипа**).

Таблица 5

Локус	Продукт	Поли-морфизм	Идентификаци-онный номер полиморфного ДНК локуса (rs)	Порядок добавления нуклеотидов (Dispensation Order)*	Анализ	Варианты генотипа
UGT1A1	Уридиндифос-фатглюкуроно-зилтрансфе-раза	(TA)5/6/7/8	rs8175347	CATATCATATG CAA	обратный	(TA)6/(TA)6 (TA)6/(TA)7 (TA)7/(TA)7

* – При настройке тестов нуклеотидную последовательность необходимо задать в поле **Dispensation Order** (порядок добавления нуклеотидов), поле **Sequence to Analyze** (последовательность для анализа) должно оставаться незаполненным. После проведения пиросеквенирования при анализе полученных результатов в поле **Sequence to Analyze**

последовательность

ПОВТОРЯЮЩИХСЯ

Недостоверными.

(1A)8 (8 1A-повторов).

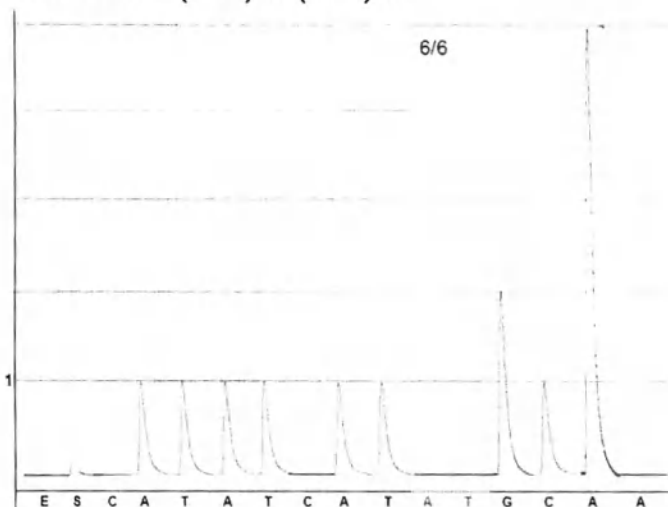
ATAT[ATAT]GGCAAAAACCAA для генотипа (1A)5/(1A)7.

генотипа (ТА)7/(ТА)8 (см. схемы ожидаемых результатов).

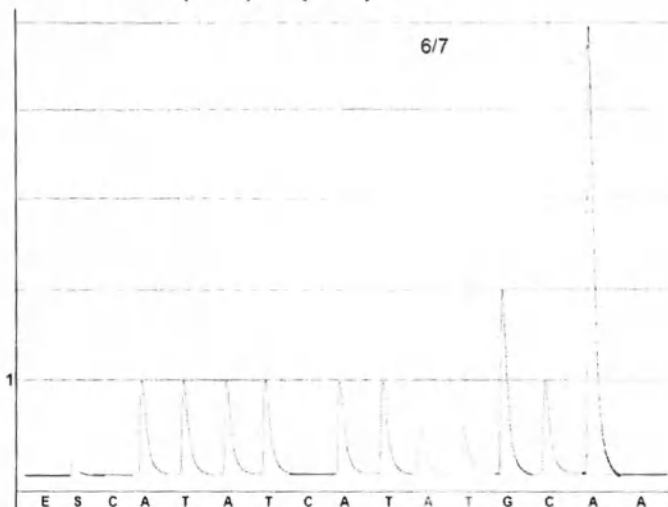
Схемы ожидаемых результатов

Локус: *UGT1A1*, полиморфизм (TA)₆/₇

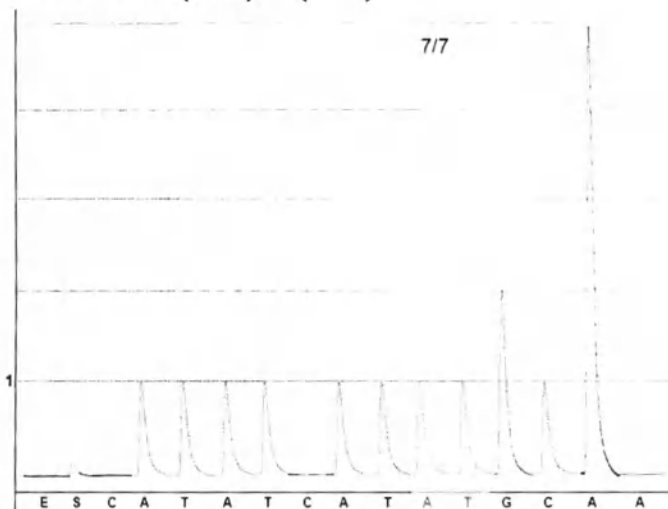
Генотип: (TA)₆/(TA)₆



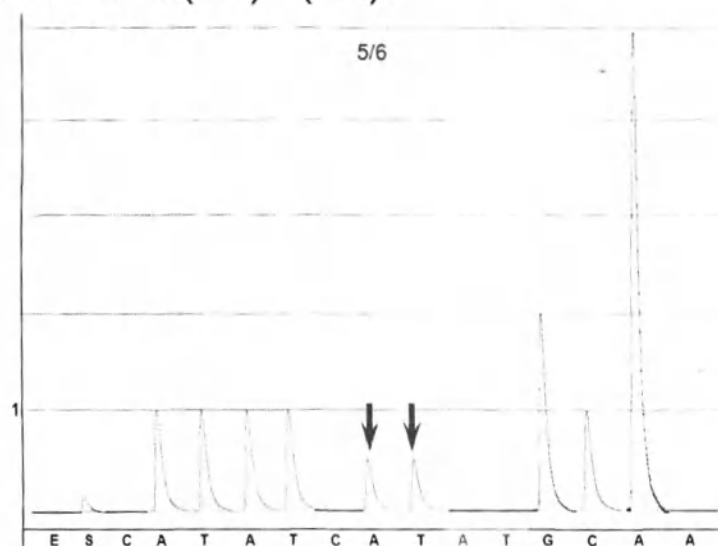
Генотип: (TA)₆/(TA)₇



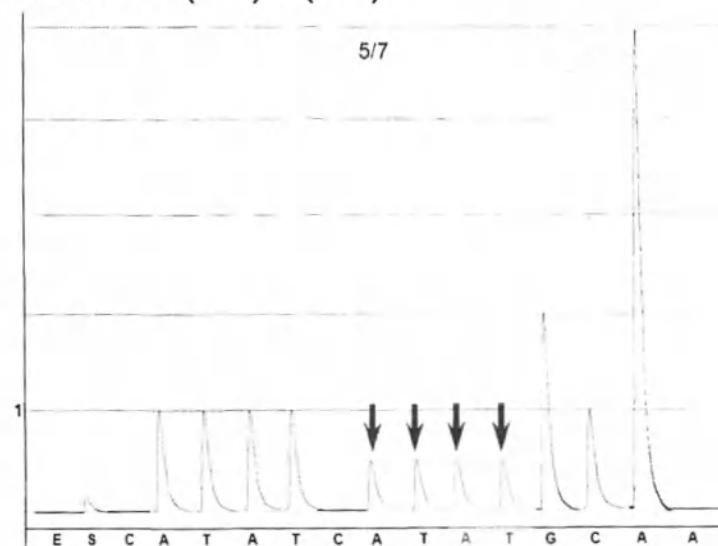
Генотип: (TA)₇/(TA)₇



Локус: *UGT1A1*, полиморфизм (TA)₅/6/7
Генотип: (TA)₅/(TA)₆



Генотип: (TA)₅/(TA)₇



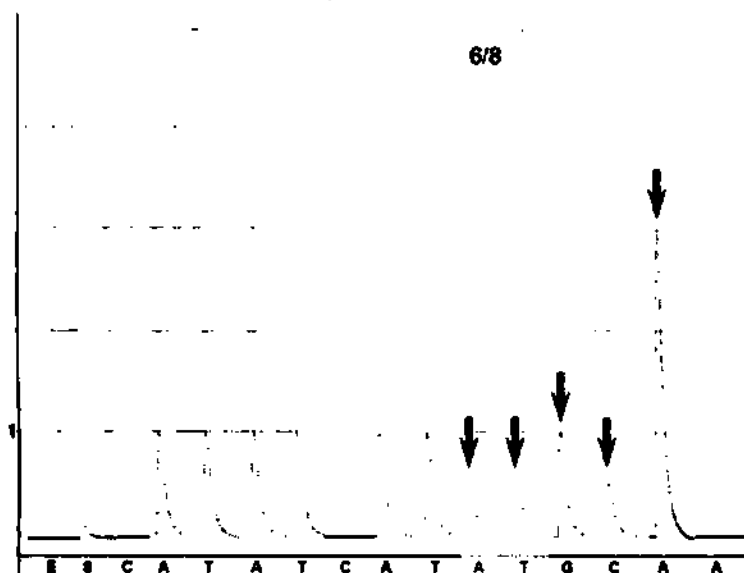
Стрелками указаны пики, по высоте которых определяется соответствие генотипам (TA)₅/(TA)₆ и (TA)₅/(TA)₇

Локус: *UGT1A1*, полиморфизм (TA)₆/₇/₈

Генотип (TA)₆/(TA)₈:

а) с использованием *Dispensation Order*

CATATCATATGCAA:

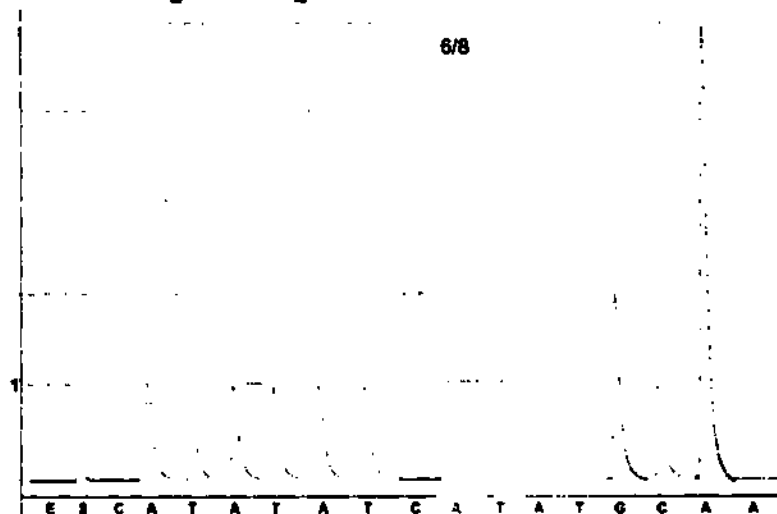


Стрелками указаны пики, по высоте которых проводится детекция генотипа

б) с использованием *Dispensation Order*

CATATATCATATGCAA и *Sequence to Analyze*

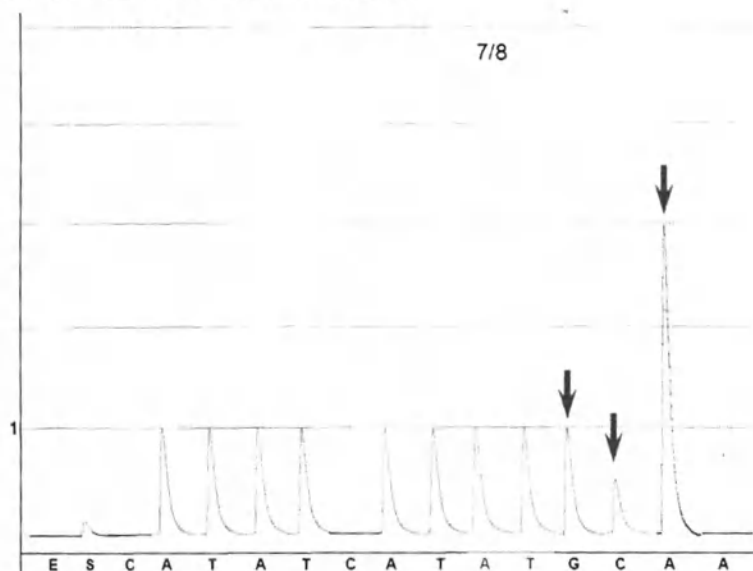
ATATAT[ATAT]GGCAAAAACCAA:



Генотип (ТА)7/(ТА)8

а) с использованием *Dispensation Order*

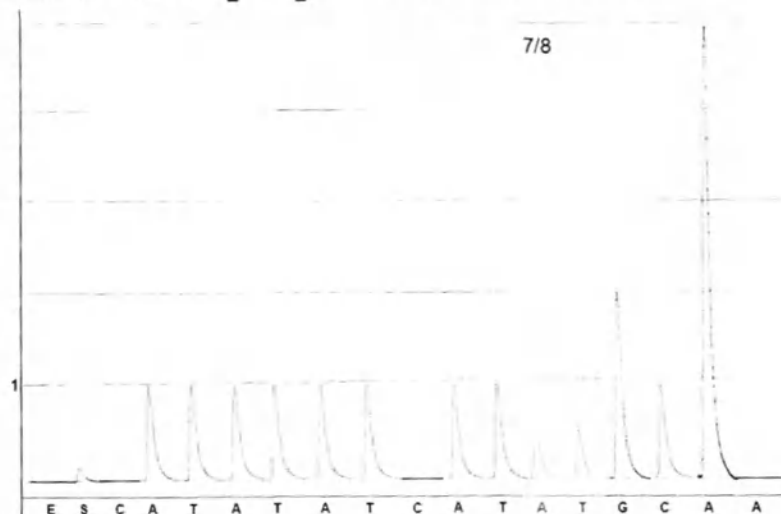
CATATCATATGCAA:



Стрелками указаны пики, по высоте которых проводится идентификация генотипа

б) с использованием *Dispensation Order*

**CATATATCATATGCAA и Sequence to Analyze
ATATATAT[AT]GGCAAAAACCAA:**

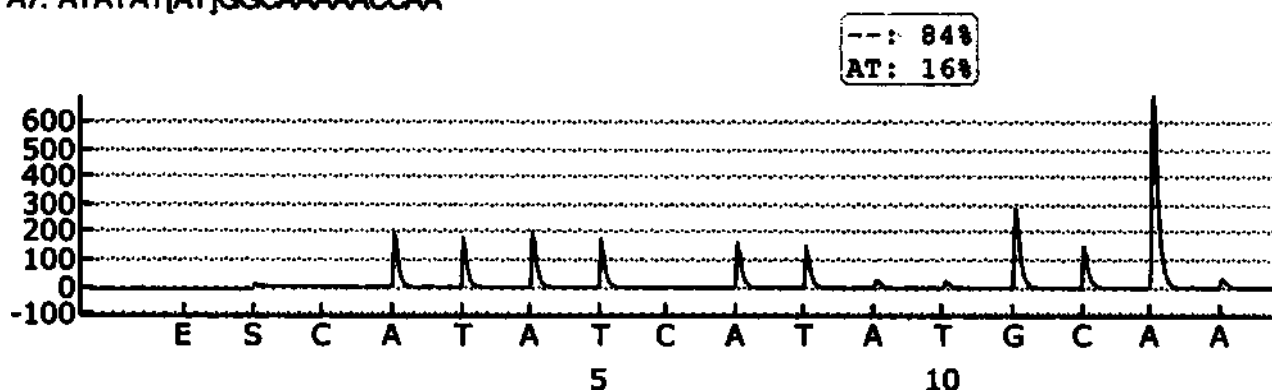


Примеры результатов

Локус: *UGT1A1*, полиморфизм (TA)₆/7

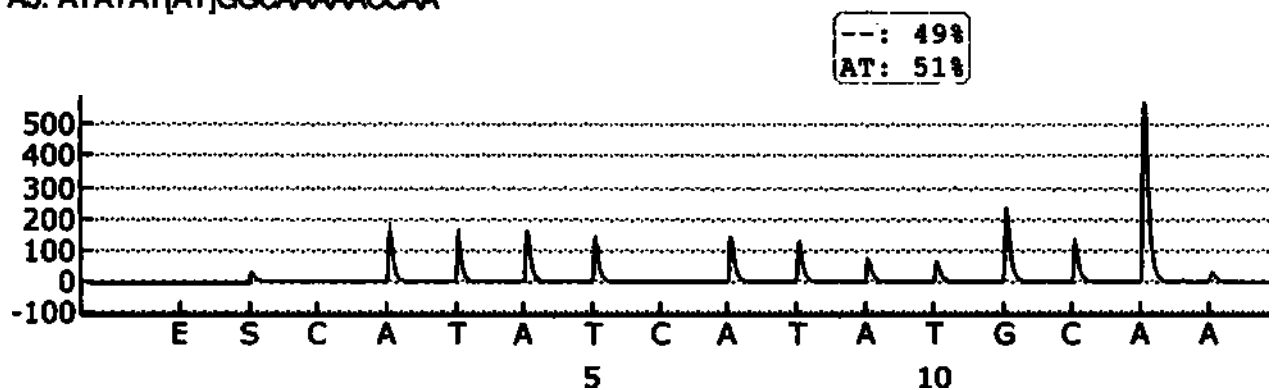
Генотип: (TA)₆/(TA)₆

A7: ATATAT[AT]GGCAAAAACCAA



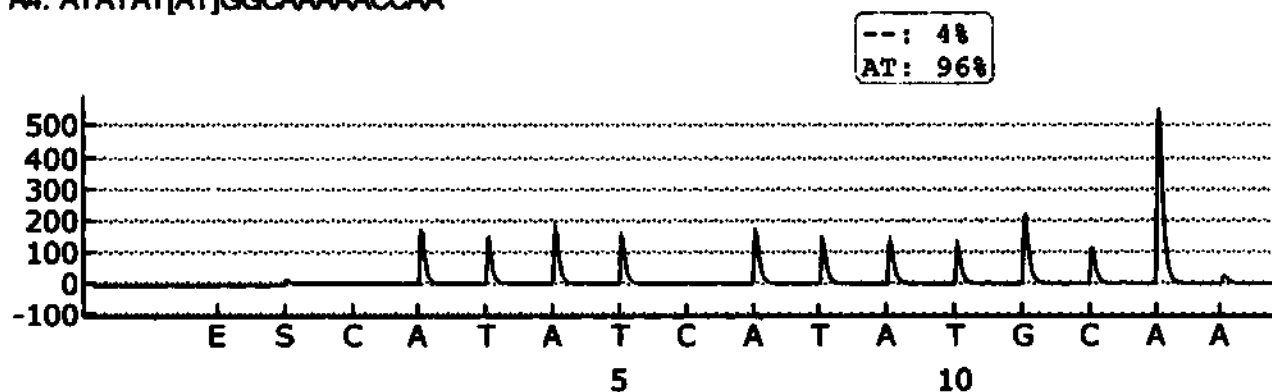
Генотип: (TA)₆/(TA)₇

A5: ATATAT[AT]GGCAAAAACCAA



Генотип: (TA)₇/(TA)₇

A4: ATATAT[AT]GGCAAAAACCAA



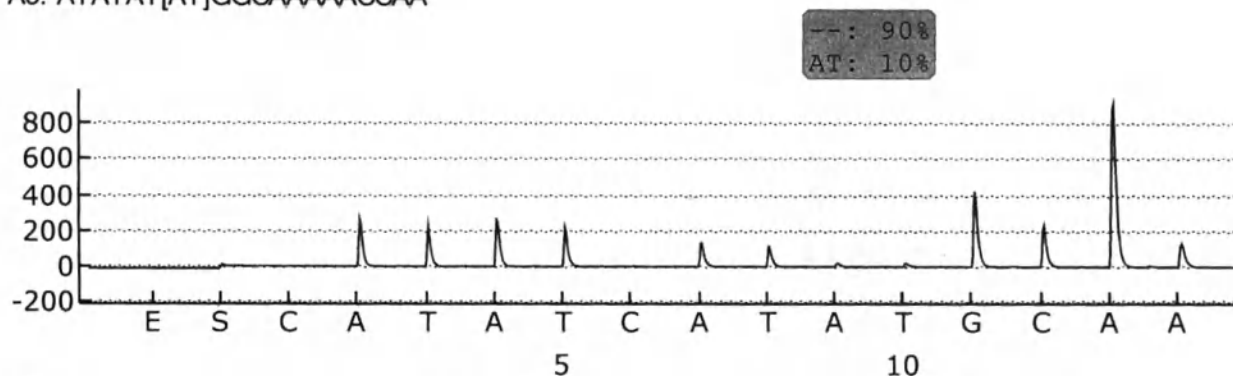
Локус: *UGT1A1*, полиморфизм (TA)₅/₆

Генотип: (TA)₅/(TA)₆

а) с использованием последовательности для анализа

(Sequence to Analyze) ATATAT[AT]GGCAAAAACCAA:

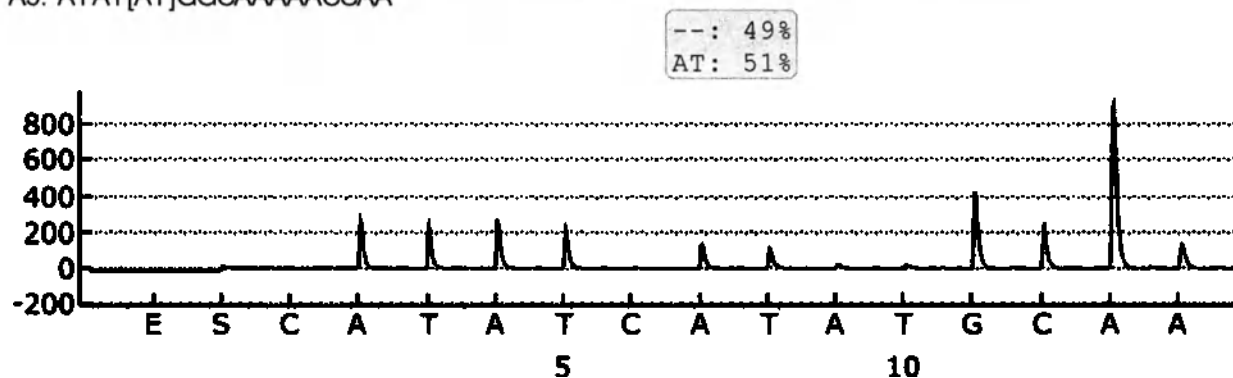
A5: ATATAT[AT]GGCAAAAACCAA



б) с использованием последовательности для анализа

(Sequence to Analyze) ATAT[AT]GGCAAAAACCAA:

A5: ATAT[AT]GGCAAAAACCAA



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. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 F, кроме полимеразы (TaqF), хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru⁸.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Содержимого достаточно для проведения п тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

прошито, пронумеровано и скреплено печатью ✓✓
Иммунодефекты листов (а)

Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

« 09 » 08 2022 г.

Б. Г. А. ИМКИ



УТВЕРЖДАЮ

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



В.Г. Акимкин

20 22 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

стандартного образца предприятия № 192 «Положительный
контрольный образец, содержащий ДНК человека»
(СОП № 192 ПКО ДНК человека)



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия 192 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК человека» (СОП № 192 ПКО ДНК человека), далее по тексту СОП, предназначенного для проведения испытаний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL», «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин титр-14-FL» «АмплиСенс® Пироскрин UGT1A1-скрин».

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП и при постановке ПЦР следует соблюдать положения 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:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытываемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытываемого набора реагентов.

3.3 Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП и дать нагреться до комнатной температуры. СОП должен представлять собой

прозрачную жидкость, не содержащую каких-либо включений или примесей. Оценить визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП перемешать и осадить капли на вортексе. Открыть пробирку и, используя наконечник с аэрозольным барьером, отобрать необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрыть.

5.2 Приготовить разведения, указанные в ТУ / методике испытаний набора реагентов, с использованием ТЕ-буфера, приложенного к СОП.

Разведения готовить по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, развести N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение провести согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N = A \quad (2)$$

$$C - A = B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП,

1×10^m – ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1.

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем ТЕ-буфера, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m копий/мл развести последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ / методике испытаний набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, приготовить последующие разведения, указанные в ТУ/методике испытаний, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, СОП имеет концентрацию $4,58 \times 10^6$ копий/мл, необходимо подготовить разведения с 1×10^6 , 1×10^5 , 3×10^5 копий/мл:

- промаркировать пробирки вместимостью 1,5 мл « 10^6 », « 10^5 », « 3×10^5 »;

Рассчитать объем ТЕ-буфера (мкл), который необходимо взять для приготовления 100 мкл (или другого необходимого объема) раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^6 , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 с использованием следующих формул:

$$4,58 \times 10^6 \text{ копий/мл} / 1 \times 10^6 \text{ копий/мл} = 4,58 \quad (1)$$

$$100 \text{ мкл} / 4,58 = 21,8 \text{ мкл} \quad (2)$$

$$100 \text{ мкл} - 21,8 \text{ мкл} = 78,2 \text{ мкл} \quad (3);$$

- в пробирку, промаркированную « 1×10^6 » вносить автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 78,2 мкл ТЕ-буфера и 21,8 мкл СОП в исходной концентрации;

- в пробирку, маркированную «10⁵», внести автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 90 мкл ТЕ-буфера и 10 мкл СОП с концентрацией 1х10⁶ копий/мл. При внесении СОП в буфер пипетировать вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешать и осадить на вортексе;
- в пробирку, маркированную «3х10⁵», внести автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 70 мкл ТЕ-буфера и 30 мкл СОП с концентрацией 1х10⁶ копий/мл. При внесении СОП в буфер пипетировать вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешать и осадить на вортексе.

Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 10³ копий/мл, можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 10³ копий/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 10³ копий/мл.

5.3 Далее провести анализ разведений СОП в соответствии с ТУ / методикой испытаний набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
СОП № 192 ПКО ДНК человека	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	1,0	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП. Срок годности и условия хранения вскрытого СОП соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВОК И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, тел. (495) 974-96-42.

прошито, пронумеровано и скреплено печатью 1
печать листов (а)

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Доверенность №
178/21 от 16.11.2021 г.)



«16» 11 2021 г. А.О.Лисицына А.О.Лисицына