



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления полиморфизмов в генах
*AGT, AGTRI, AMPD1, APOC3, APOE, EDN1, F2, F5, F7, FGB, GP1BA, IL10, IL17F, ITGA2, ITGB3, LIPC,
LPL, MTHFR, MTR, MTRR, NOS3, P2RY12, PON1, SELE, SELP, SERPINE1(PAII), TF (F3)*

SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА предназначен для выявления полиморфизмов в геноме человека методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР).

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2. Набор реагентов SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА может быть использован в клинической медицине для выявления полиморфизмов в геноме человека с целью оценки риска возникновения заболеваний сердечно-сосудистой системы, подбора индивидуальной дозы лекарства и т.д.

1.3. Набор имеет разные форматы, различающиеся комплектацией (определяемым полиморфизмом, числом реакционных доз - постановочных реакций, степенью готовности компонентов к постановке амплификации) и способом детекции амплифицированного фрагмента ДНК (электрофоретическое разделение продуктов в агарозном геле или флуоресцентная детекция результатов в реальном времени на адаптированных для этого приборах).

Набор рассчитан на проведение анализа 50 или 100 неизвестных образцов, 10 или 20 проб контрольных образцов (всего 60 или 120 определений).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

2.1. Набор реагентов SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА основан на использовании метода аллель-специфической полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР): варибельный нуклеотид располагается на 3'-концевой части праймера, при этом Taq-полимераза с различной скоростью удлиняет полностью комплементарный и частично некомплементарный матрице праймер. С образцом выделенной ДНК параллельно

проводятся две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции. Условия реакции подобраны таким образом, что специфический продукт, образованный с полностью комплементарного матрице праймера, образуется значительно раньше, чем неспецифический, образованный с частично некомплементарного, который не выявляется при детекции методом электрофореза или отсекается по гораздо более позднему циклу выхода кривой флуоресценции. Разница циклов выхода специфической и неспецифической кривых составляет 6 и более циклов, в то время как разница между циклами выхода специфических кривых для гетерозиготы – 1-1,5 цикла.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).
2. Постановка реакции ПЦР-амплификации
3. Детекция продуктов амплификации.

2.2. Состав набора

В состав набора реагентов входят три комплекта:

2.2.1. Комплект для пробоподготовки представляет реагент для выделения ДНК из лейкоцитов цельной крови «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» (табл. 1).

Таблица 1

Состав, маркировка	Комплектация
"ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь"	1 флакон - 60 мл

Комплекты реагентов для проведения АС-ПЦР -амплификации.

Комплекты реагентов для проведения АС-ПЦР различаются:

- способом детекции амплифицированного фрагмента ДНК (формат, табл.2),
- числом реакционных доз - постановочных реакций (табл.2),
- определяемым полиморфизмом (табл. 3).

Варианты форматов комплекта реагентов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Формат Маркировка	Состав	Комплектация 50 реакций	Комплектация 100 реакций
Формат «ЭлектроФорез» Маркировка ЭФ	1. 10х Реакционная смесь АЛЛЕЛЬ 1* 2. 10х Реакционная смесь АЛЛЕЛЬ 2* 3. Taq-полимераза..... 4. Разбавитель..... 5. Минеральное масло..... 6. Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка - 150 мкл 1 пробирка - 150 мкл 1 пробирка - 25 мкл 1 пробирка - 2 мл 1 пробирка - 2 мл 1 пробирка - 60 мкл	1 пробирка - 300 мкл 1 пробирка - 300 мкл 1 пробирка - 50 мкл 2 пробирки - 4 мл 2 пробирки - 4 мл 1 пробирка - 120 мкл
Формат «в Реальном Времени» Маркировка РВ	1. 10х Реакционная смесь АЛЛЕЛЬ 1* 2. 10х Реакционная смесь АЛЛЕЛЬ 2* 3. Taq-полимераза..... 4. Разбавитель..... 5. Минеральное масло..... 6. Краситель SYBR GREEN 7. Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка - 150 мкл 1 пробирка - 150 мкл 1 пробирка - 25 мкл 2 пробирки - 4 мл 2 пробирки - 4 мл 1 пробирка - 55 мкл 1 пробирка - 120 мкл	1 пробирка - 300 мкл 1 пробирка - 300 мкл 1 пробирка - 50 мкл 3 пробирки - 6 мл 3 пробирки - 6 мл 1 пробирка - 55 мкл 1 пробирка - 120 мкл

Комплект для проведения амплификации включает готовые к применению реагенты.

*В состав 10х реакционных смесей входят:

- раствор дНТФ;
- ПЦР-буфер;
- раствор специфичных праймеров**;

**Праймеры варьируются в зависимости от определяемого полиморфизма.

Варианты комплектаций реагентов в зависимости от вида полиморфизма представлены в таблице 3.

Комплекты реагентов в зависимости от вида полиморфизма

Таблица 3.

кат. номер комплекта	Наименование комплекта
118	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Thr174Met в гене AGT
119	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Met235Thr в гене AGT
131	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма A1166C в гене AGTR1
183	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Gln12Ter в гене AMPD1
132	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма C3238G в гене APOC3
148	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Leu28Pro в гене APOE
181	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Lys198Asn в гене EDN1
102	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма 20210G/A в гене F2
101	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Arg506Gln в гене F5
105	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Arg353Gln в гене F7
135	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма -323ins10bp в гене F7
107	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма - 455G-A в гене FGB
179	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Thr145Met в гене GPIBA
187	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма -592 C>A в гене IL10
172	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма His161Arg в гене IL17F
155	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма C807T в гене ITGA2
106	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Leu33Pro в гене ITGB3
161	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма - 250G>A в гене LIPC
162	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма C-514T в гене LIPC
149	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Ser447Ter в гене LPL
103	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Ala222Val в гене MTHFR
143	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Asp919Gly в гене MTR
124	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Ile22Met в гене MTRR
182	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма C-786T в гене NOS3
180	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма H1/H2 в гене P2RY12
125	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Gln192Arg в гене PON1
294	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Ser128Arg в гене SELE
295	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Leu554Phe в гене SELE
287	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма Thr715Pro в гене SELP
120	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма - 675 5G/4G в гене SERPINE1 (PAI1)
307	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма A-603G в гене TF (F3)
308	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма C-1322T в гене TF (F3)
309	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма G-1442C в гене TF (F3)
312	Комплект реагентов для АС-ПЦР выявления полиморфизма C-1812T в гене TF (F3)

Комплект для проведения амплификации (по желанию клиента) может также представлять готовую к применению расфасованную по индивидуальным пробиркам амплификационную смесь (маркировка OneStep).

2.2.3. Комплект реагентов для электрофоретической детекции (табл. 4)

Таблица 4

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Комплект №1	1. Агароза 2. Раствор бромистого этидия 3. 50-кратный ТАЕ-буфер	2 флакона (по 2,0 г) 1 пробирка (30 мкл) 2 флакона (по 13 мл)
Комплект №2	1. 3% агарозный гель (40 лунок) 2. 50-кратный ТАЕ-буфер	3 планшета 1 флакон – 25 мл

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность анализа

С помощью набора SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА можно обнаружить 10^6 и более копий человеческой ДНК в мл цельной крови.

3.2. Специфичность анализа

100% специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к определенным аллелям генов человека и условиями реакции амплификации. Использование набора SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА позволяет выявлять и дифференцировать однобуквенные замены, делеции и инсерции в геноме человека.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - соблюдение “Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР” (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с анализируемым биоматериалом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1 этап - выделение ДНК из биопроб:

- ламинарный бокс II класса защиты;
- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8000-12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1500-3000 об/мин (или вортекс);
- пипетка-дозатор переменного объема 100-1000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые пробирки типа Эппендорф 1,5 мл с замком;
- одноразовые наконечники до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 1000 мкл;- штатив с крышкой для хранения пробирок 1,5 мл;
- штатив для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- одноразовые перчатки;
- холодильник с морозильной камерой;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- емкость с дез. раствором для удаления плазмы крови;
- реагент для выделения ДНК из биопроб «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» (универсален для всех полиморфизмов).

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации.

Для всех форматов

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3 тыс.об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для работы с биопробами;
- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5 - 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые наконечники до 10, 50, 200 и 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;

- емкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- комплект реагентов для проведения ПЦР (индивидуален для каждого полиморфизма).

Для Формата ЭФ:

- программируемый термостат (амплификатор) с точным типом регулирования;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации.

Для Формата РВ:

- анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- бесцветные (возможно, оптические или с оптическими крышками) одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл или 0,2 мл для амплификации согласно требованиям производителя прибора.

3 этап - детекция продуктов амплификации (для Формата ЭФ).

- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В;
- УФ-трансиллюминатор;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- технические весы для взвешивания агарозы;
- аквадистиллятор;
- видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключенная к персональному компьютеру;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для нанесения образцов на гель;
- пипетка-дозатор переменного объема 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники до 200 мкл для нанесения образцов;
- одноразовые наконечники до 1000 мкл;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- комплект реагентов для электрофоретической детекции №1 или №2;
- планшет для заливки геля, гребенки, зажимы типа «бульдог»;
- пластиковая емкость большого объема для дезактивации буфера и гелей;

6. ПРОБОПОДГОТОВКА

6.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

2000 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 200 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). Гепарин использовать не рекомендуется.

Внимание! При использовании для забора крови вакуумных пробирок с ЭДТА или цитратом натрия дополнительное внесение антикоагулянта не требуется. При этом объем крови, необходимый для исследования, заранее маркируется на пробирке в соответствии с количеством антикоагулянта, помещенного в пробирку.

Неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК; хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; не замораживать!

6.2. Выделение ДНК.

6.2.1. В пробирку типа «Эппендорф» с замком внести 1000 мкл цельной крови. Перед внесением кровь необходимо перемешать до однородности.

6.2.2. Закрывать пробирку и центрифугировать со скоростью 3000 об/мин. при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы. На поверхности осадка форменных элементов расположен тонкий слой лейкоцитов.

6.2.3. Аккуратно удалить пипеткой плазму, не захватив при этом лейкоциты. ВНИМАНИЕ! Полное удаление плазмы без захвата лейкоцитов практически невозможно. Поэтому следует оставить в пробирке тонкий слой плазмы.

6.2.4. Закрывать пробирку и выдерживать ее при -20°C (в морозилке) до полного замораживания форменных элементов (в течение 1 ч.).

6.2.5. Полностью разморозить содержимое пробирки при комнатной температуре.

6.2.6. Внести в пробирку реактив «ДНК-экспресс-кровь». Его объем должен быть равен объему оставшихся в пробирке форменных элементов и плазмы (в примере объем остатка равен ~550 мкл, суммарный объем остатка и реактива составил, таким образом, 1100 мкл). Закрыть пробирку, защелкнуть замочек.

6.2.7. Содержимое пробирки в течение 10 сек. тщательно перемешать на вортексе.

6.2.8. Осадить капли на микроцентрифуге.

6.2.9. Установить пробирку в предварительно прогретый до 99°C термостат и выдерживать при 99°C в течение 15 минут.

6.2.10. Установить пробирку в высокоскоростную микроцентрифугу замком в сторону оси. Центрифугировать со скоростью 8000-14000 об/мин. при комнатной температуре в течение 1 минуты.

6.2.11. Полученный таким образом супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК. Если необходимо сохранить выделенную ДНК для дальнейшего использования, супернатант следует перенести в отдельную пробирку типа «Эппендорф» и хранить при -20°C (в морозилке) до 1 года. Перед употреблением образец необходимо полностью разморозить при комнатной температуре и тщательно перемешать.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение ПЦР-амплификации с использованием комплекта реагентов Формата ЭФ (ЭлектроФорез).

7.1.1. Приготовить и пронумеровать пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) в соответствии с количеством анализируемых проб, включая отрицательный и положительный контроли. Для каждой пробы готовятся 2 пробирки **1** (АЛЛЕЛЬ 1) и **2** (АЛЛЕЛЬ 2).

7.1.2. За 20-30 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для ПЦР из морозильника, разморозить содержимое. Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно перемешать. Перемешивание разбавителя происходит при переворачивании пробирки (пузырь воздуха). Перемешивание реакционной смеси проводят вортексированием.

7.1.3. Из компонентов комплекта приготовить рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:

17,5 мкл разбавителя,

2,5 мкл реакционной смеси,

0,2 мкл Taq-полимеразы (вносится в последнюю очередь и перед ее

внесением смесь рекомендуется немного перемешать)

Готовятся 2 рабочие смеси: с реакционной смесью «**АЛЛЕЛЬ 1**» и с реакционной смесью «**АЛЛЕЛЬ 2**».

***ВНИМАНИЕ!** При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!*

7.1.4. После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

7.1.5. Добавить по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки, подготовленные для амплификации.

7.1.6. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.

7.1.7. Внести по 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. выделение ДНК) в пробирку с рабочей амплификационной смесью «**АЛЛЕЛЬ 1**» и в пробирку с рабочей амплификационной смесью «**АЛЛЕЛЬ 2**» под слой масла. В качестве отрицательного контрольного образца вносится разбавитель в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

7.1.8 Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1500–3000 об/мин при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе.

7.1.9. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C (установившаяся температура в режиме Пауза) программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

Температура	Время	Кол-во циклов
94 °C	Пауза	
93 °C	1 мин	1
93 °C	10 сек	35
64 °C	10 сек	
72 °C	20 сек	
72 °C	1 мин	1
10 °C	хранение	

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на примере прибора Терцик (ДНК-Технология). По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА.

7.2. Проведение ПЦР-амплификации с использованием комплекта реагентов Формата РВ (в Реальном времени).

7.2.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке бесцветные пробирки с оптическими крышками вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается! Для каждой пробы готовятся 2 пробирки 1 (АЛЛЕЛЬ 1) и 2 (АЛЛЕЛЬ 2).

7.2.2. За 20 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для ПЦР из морозильника, разморозить содержимое. Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого. Непрозрачную пробирку с красителем SYBR Green рекомендуется сначала центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе, чтобы сбросить капли с крышки на дно, затем встряхнуть для перемешивания содержимого и снова центрифугировать.

7.2.3. Из компонентов комплекта приготовить рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:

17,5 мкл разбавителя,
2,5 мкл реакционной смеси,
0,2 мкл красителя SYBR Green.

0,2 мкл Taq-полимеразы (вносится в последнюю очередь и перед ее внесением смесь рекомендуется немного перемешать)

Готовятся 2 рабочие смеси: с реакционной смесью «АЛЛЕЛЬ 1» и с реакционной смесью «АЛЛЕЛЬ 2».

Смесь тщательно перемешать пипетированием (если объем <200 мкл) или импульсным вортексированием 15-20 раз.

7.2.4. Внести в приготовленные пробирки по 20 мкл полученной рабочей смеси.

7.2.5. Внести по 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. выделение ДНК) в пробирку с рабочей амплификационной смесью «АЛЛЕЛЬ 1» и в пробирку с рабочей амплификационной смесью «АЛЛЕЛЬ 2». В качестве отрицательного контрольного образца вносится разбавитель, в качестве положительного контроля - положительный контрольный образец ДНК в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

7.2.6. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе (если

используются плашки или стрипованные пробирки – на предназначенной для этого центрифуге; значение угловой скорости (об/мин) в этом случае может отличаться от указанного).

7.2.7. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C (установившаяся температура в режиме Пауза) детектирующий амплификатор и провести амплификацию по следующей программе:

Температура	Время	Кол-во циклов
94 °C	Пауза	
93 °C	1 мин	1
93 °C	10 сек	35
64 °C	10 сек	
72 °C*	20 сек	
72 °C	1 мин	1
10 °C	хранение	

* детекция флуоресценции по каналу SYBR

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на примере прибора IQ5 (BioRad). По вопросу адаптации программ для использования на других моделях детектирующих амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Детекция продуктов амплификации для набора реагентов Формата ЭФ (ЭлектроФорез).

8.1.1. Залить в аппарат для электрофореза ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ в 50 раз (pH=8,3).

Примечание. При использовании «Комплекта для электрофоретической детекции № 2» проведение электрофореза начинать с п. 8.1.5.

8.1.2. Приготовить 3% агарозу из расчета на 1 гель: к 1,5 г агарозы добавить 1 мл 50х ТАЕ буфера и 55 мл дистиллированной воды (включен запас на испарение).

8.1.3. Приготовленную смесь расплавить на электрической плите или в СВЧ-печи на небольшой мощности. Добавить к 50 мл расплавленной агарозы 5 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать.

8.1.4. Расплавленную агарозу сразу же залить в планшет для заливки геля. Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образцов установить на планшет гребенку, используя зажим типа «бульдог».

Внимание! Для лучшего разрешения рекомендуется использовать как можно более тонкие гребенки!

После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза (если нанесение образцов производится вне камеры, то следует предварительно смочить карманы буфером для электрофореза).

8.1.5. Нанести в карманы геля по 10-15 мкл амплификата в последовательности, соответствующей нумерации проб.

8.1.6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/См геля (для камеры с расстоянием между электродами 27 см максимальное напряжение 150 В). Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта 1,5-

2 см (полосы ампликонов будут опережать полосу красителя, оптимальное время разгонки—17 минут).

8.2. Регистрация результатов электрофореза

8.2.1. Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора.

ВНИМАНИЕ! С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.

8.2.2. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа (визуальную детекцию проводить только с защитным экраном, либо в очках, не пропускающих УФ излучение). Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос под УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

8.2.3. Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра.

8.3. Детекция продуктов амплификации для набора реагентов Формата РВ (в Реальном времени).

8.3.1. Детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени» осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по заданному для образцов каналу.

9. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов для набора реагентов Формата ЭФ (ЭлектроФорез).

Типичная электрофореграмма продуктов амплификации представлена на рис 1.



Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации.

9.1.1. В отрицательном контрольном образце должны отсутствовать какие-либо полосы. Появление второй полосы на уровне специфического ампликона свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

9.1.2. В положительном контрольном образце полосы оранжево-красного цвета (около 80 н.п.) должны присутствовать как в смеси «АЛЛЕЛЬ 1», так и в смеси «АЛЛЕЛЬ 2».

9.1.3. Анализируемые пробы.

Присутствие полосы оранжево-красного цвета (около 80 н.п.) в смеси «АЛЛЕЛЬ 1» свидетельствует о наличии этой аллели в анализируемой пробе.

Присутствие полосы оранжево-красного цвета (около 80 н.п.) в смеси «АЛЛЕЛЬ 2» свидетельствует о наличии этой аллели в анализируемой пробе.

Если полоса оранжево-красного цвета (около 80 н.п.) присутствует в смеси «АЛЛЕЛЬ 1» и отсутствует в смеси «АЛЛЕЛЬ 2», то анализируемый образец является гомозиготой по аллели 1.

Если полоса оранжево-красного цвета (около 80 н.п.) отсутствует в смеси «АЛЛЕЛЬ 1» и присутствует в смеси «АЛЛЕЛЬ 2», то анализируемый образец является гомозиготой по аллели 2.

Если полосы оранжево-красного цвета (около 80 н.п.) присутствуют как в смеси «АЛЛЕЛЬ 1», так и в смеси «АЛЛЕЛЬ 2», то анализируемый образец является гетерозиготой по данному полиморфизму.

Если специфический ампликон отсутствует в обеих реакционных смесях, это означает, что реакция амплификации не прошла (возможные причины: проба содержит вещества, ингибирующие ПЦР; неадекватная работа амплификатора; ошибка выполнения процедуры проведения анализа и др.). В этом случае необходимо провести повторный анализ, начиная со стадии выделения ДНК.

При интерпретации результатов важно помнить о невозможности появления в данных анализах слабopоложительных проб. Все полосы на электрофореze должны быть четкими и одинаковой интенсивности (допускаются небольшие различия в яркости как между тестами на аллель 1 и аллель 2, так и от пробы к пробе). Причинами появления малоинтенсивных полос на электрофореze могут являться: 1) Ошибка при проведении анализа или некорректная работа амплификатора; 2) Частичное вытекание амплификата из кармана (малоинтенсивна как полоса ампликона, так и полоса димеров праймеров); 3) Контаминация образца или затекание амплификата из соседнего кармана геля.

9.2. Анализ результатов для набора реагентов Формата РВ (в Реальном времени) проводится по кривым накопления флуоресцентного сигнала (рис.2, 3, 4, 5).

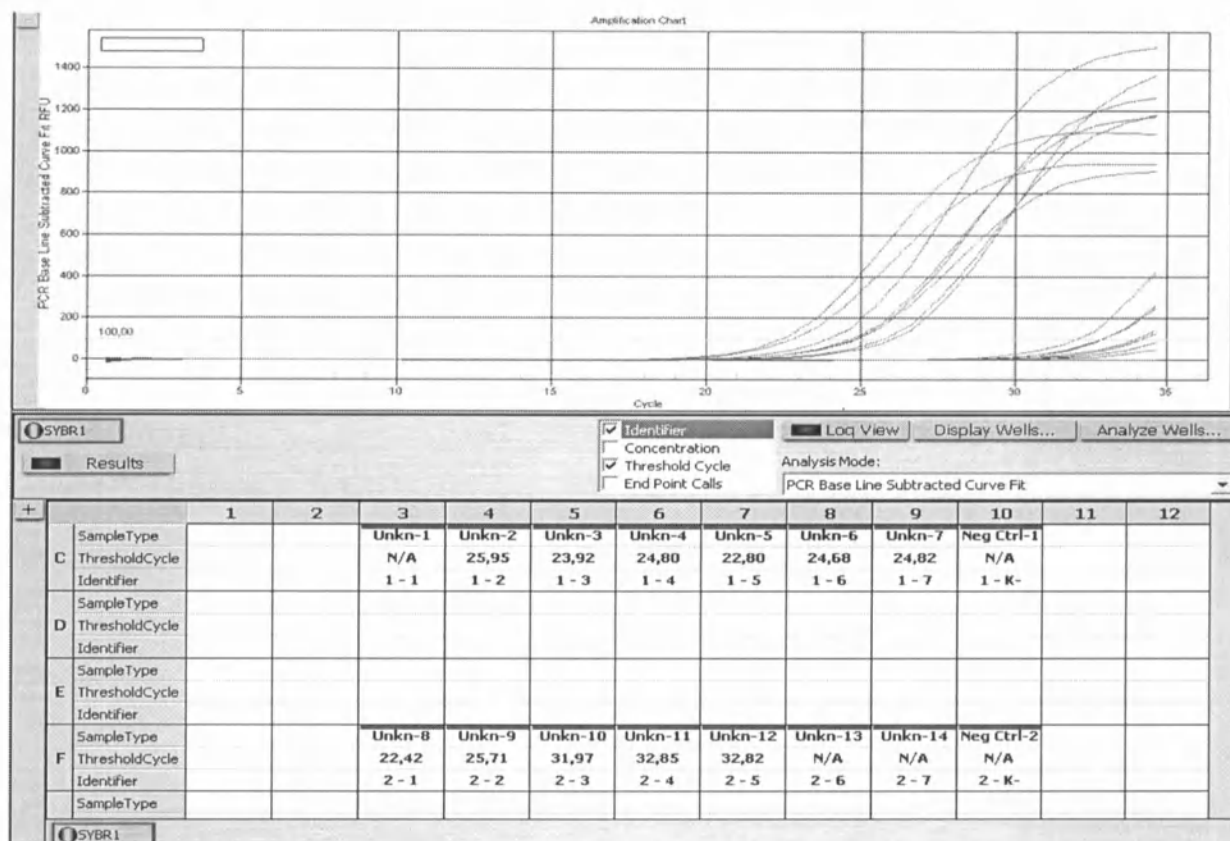


Рис.2. Типичный вид кривых накопления флуоресцентного сигнала.

9.2.1. Пороговая линия для отсечки шума и анализа, а также циклы выравнивания выбираются согласно таблице 5.

Таблица 5

Канал	Пороговая линия	Конечный цикл (КЦ)	Базовая линия
SYBR	100*	30	5-15

* *Примечание.* Значение пороговой линии установлено для реакции на примере прибора IQ5 (BioRad). По вопросу установления значений для отсечки шума и анализа для других моделей детектирующих амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА.

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления фонового сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора (рис.3, 4, 5).

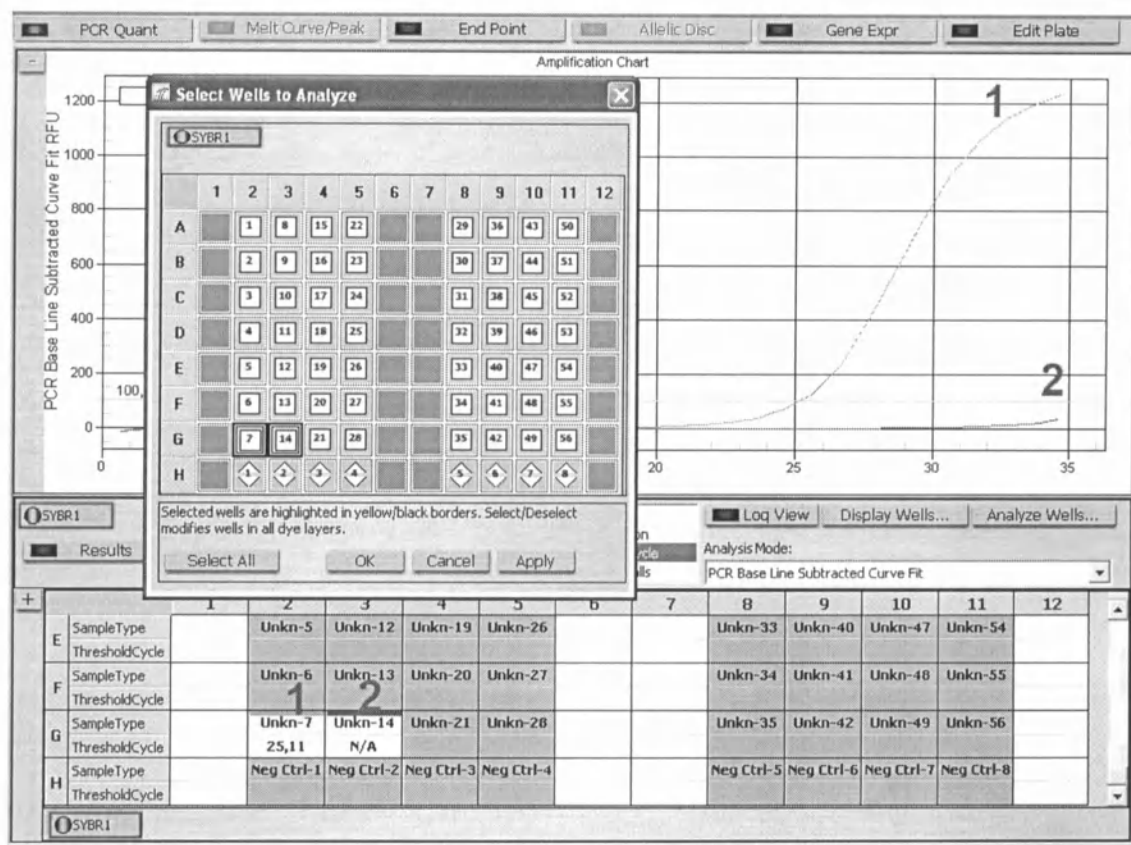


Рис.3. Кривые накопления флуоресцентного сигнала для образца, являющегося гомозиготой по аллели 1.

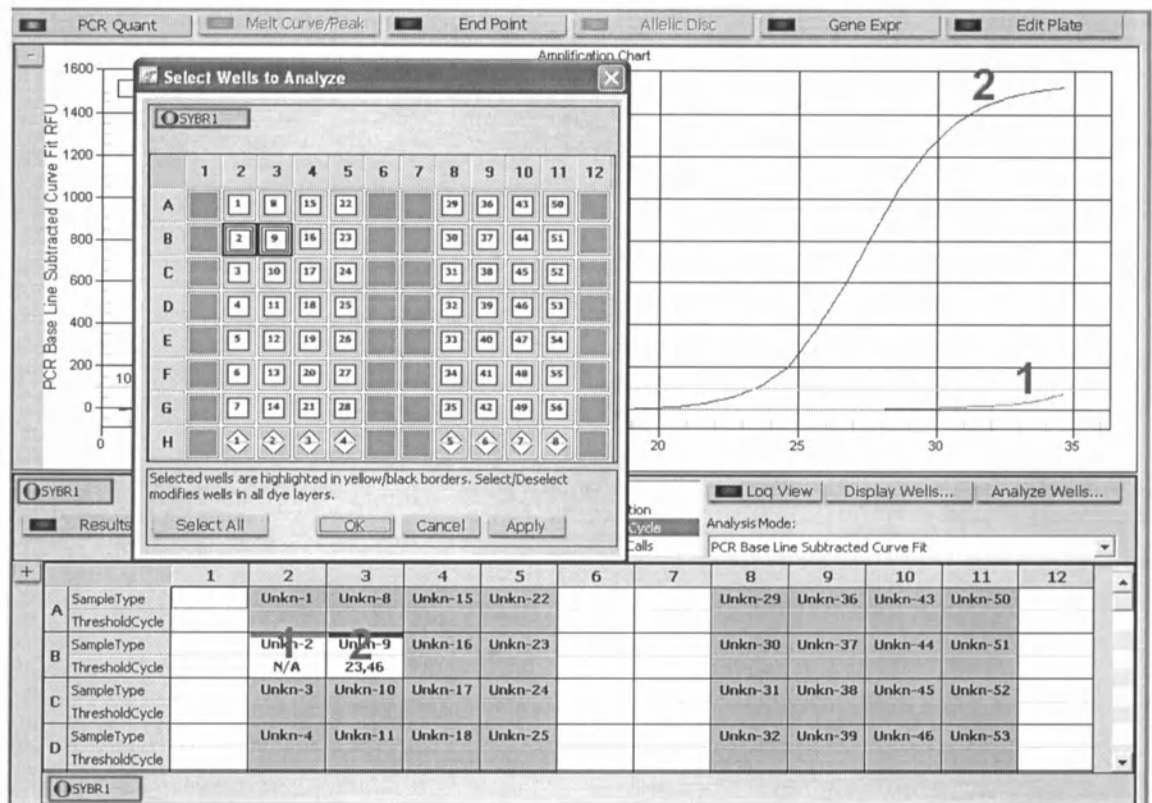


Рис.4. Кривые накопления флуоресцентного сигнала для образца, являющегося гомозиготой по аллели 2.

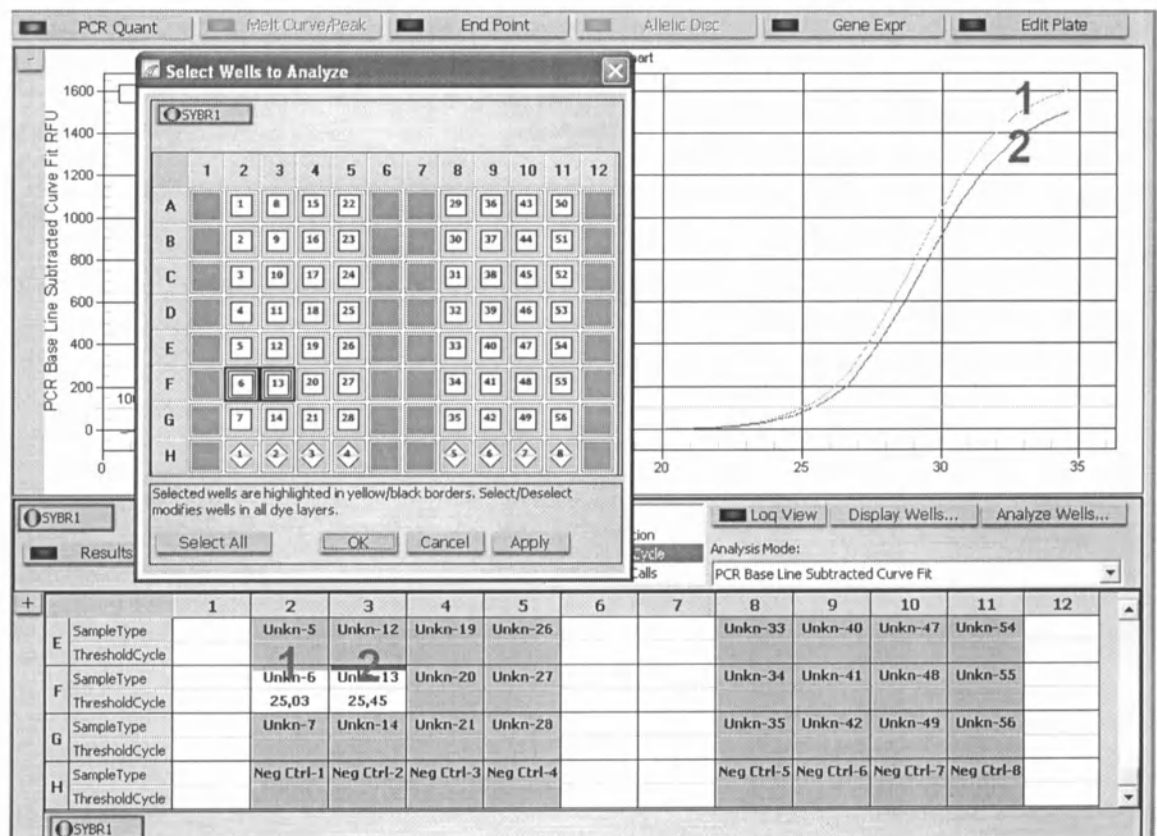


Рис.5. Кривые накопления флуоресцентного сигнала для образца, являющегося гетерозиготой.

9.2.2. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6

	АЛЛЕЛЬ 1	АЛЛЕЛЬ 2	Результат
К+	+	+	Специфическая реакция прошла
	-	+	Амплификация не прошла в смеси АЛЛЕЛЬ 1, возможно нарушение методики постановки
	+	-	Амплификация не прошла в смеси АЛЛЕЛЬ 2, возможно нарушение методики постановки
	-	-	Амплификация не прошла в обеих смесях, возможно нарушение методики постановки
К-	-	-	Специфическая контаминация отсутствует, уровень праймер-димеров в пределах нормы
Анализируемый образец	+	-	Гомозигота по аллели 1
	-	+	Гомозигота по аллели 2
	+	+	Гетерозигота
	-	-	Амплификация не прошла

Примечание. Приведенные характеристики конечного цикла и пороговые значения представлены на примере прибора Bio-Rad iQ5. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов SNP-ЭКСПРЕСС-КАРДИОГЕНЕТИКА.

Приведенные значения подходят к приборам данного типа в большинстве случаев. Однако для отдельных приборов или после перекалибровки шкала интенсивности может измениться. При правильном положении Threshold Ct специфических кривых находится в пределах 20-25 циклов.

Для дополнительного контроля: в общем случае неспецифические слабоинтенсивные кривые (амплификация с неспецифических праймеров, праймер-димеры) выходят на 6 и более циклов позже специфических. В случае гетерозиготы разница между Ct образца в смесях АЛЛЕЛЬ 1 и АЛЛЕЛЬ 2 находится в пределах 1-1,5 циклов.

9.3. Трактовка результатов. Полученные результаты предназначены для использования специалистами в области «медицинская генетика».

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Комплект для пробоподготовки (выделение ДНК) должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплекта при температуре до 25°C не более 5 суток.

10.2. Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре 2-8°C не более 5 суток.

10.3. Краситель SYBR GREEN должен храниться в непрозрачной пробирке при +4°C. Допускается хранение красителя при температуре 2-8°C не более 5 суток. Краситель не замораживать!

10.4. Срок годности набора – 6 месяцев.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (499)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru.

Исполнительный директор

ООО НПФ «Литех»



Байцур С.Г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



Долгов В.В.

Подпись *В.В. Долгова*
Удостоверяю:
Специалиста по кадрам РМАПО
Подпись *Н.С. Желудков*
"19" 12 2011 года