

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПО ДНК-Технология»

В.Ю.Дмитровский

«09» августа 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

к набору реагентов для определения генетических полиморфизмов,
ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом полимеразной
цепной реакции (ОнкоГенетика)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов ОнкоГенетика предназначен для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом ПЦР в режиме реального времени в препаратах ДНК человека, полученных из цельной периферической крови.

1.2 Набор реагентов может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип действия набора.

В основе работы комплектов реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок)



ГЕН. ДИРЕКТОР
ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.

комплементарных специфическому участку ДНК и последующей достройки полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

В смесь для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки FAM и HEX, на каждый вариант определяемого генетического полиморфизма. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления сигнальных зондов, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура его плавления будет отличаться от температуры плавления полностью комплементарного зонда. На основании температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

2.2 Состав набора.

Набор выпускается в формате «в режиме реального времени», предназначенном для детекции результатов ПЦР с помощью детектирующих амплификаторов.

Набор включает следующие компоненты:

А) ОнкоГенетика BRCA. Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития рака молочной железы, методом ПЦР в режиме реального времени

1. BRCA1: 185delAG
2. BRCA1: 4153delA
3. BRCA1: 5382insC
4. BRCA1: 3819delGTAAA
5. BRCA1: 3875delGTCT
6. BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly)

7. BRCA1: 2080delA

8. BRCA2: 6174delT;

- ПЦР-буфер – 8 пробирок (по 480 мкл);

- Taq-АТ-полимераза – 8 пробирок (по 24 мкл);

- минеральное масло – 8 пробирок (по 960 мкл).

б) ПК BRCA. Комплект положительных контрольных образцов:

- К+1 [гомозиготный по нормальному аллелю] - 1 пробирка (270 мкл),

- К+2 [гетерозиготный] - 1 пробирка (270 мкл).

Генотипы, определяемые при тестировании положительных контрольных образцов, указаны в таб. 1.

Таблица 1. Генотипы, определяемые при тестировании положительных контрольных образцов.

Полиморфизм	Название положительного контрольного образца, определяемый генотип	
	К+1 [гомозиготный по нормальному аллелю]	К+2 [гетерозиготный]
BRCA1: 185delAG	NN	NDel
BRCA1: 4153delA	NN	NDel
BRCA1: 5382insC	NN	NIns
BRCA1: 3819delGTAAA	NN	NDel
BRCA1: 3875delGTCT	NN	NDel
BRCA1: 300T>G (Cys61Gly)	TT	TG
BRCA1: 2080delA	NN	NDel
BRCA2: 6174delT	NN	NDel

2.3 Время проведения анализа – 2 ч.

2.4 Каждый набор рассчитан на проведение 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации должен определяться генотип исследуемого образца.

3.2 Чувствительность

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует адекватную работу комплектов.

В образцах с недостаточным количеством ДНК после завершения реакции амплификации регистрируется сомнительный результат.

Примечание - Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для контроля взятия материала методом ПЦР (КВМ), производства ООО «НПО ДНК-Технология».

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2 Мерами предосторожности при работе с набором реагентов является 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.).

4.3 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4 Работу с набором реагентов и анализируемыми образцами следует проводить в одноразовых медицинских перчатках без талька.

4.5 На стадиях приготовления реакционной смеси необходимо использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6 Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов.

4.7 Экстракцию ДНК и приготовление реакционной смеси следует проводить в ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком или ПЦР-боксах.

4.8 Для предотвращения контаминации этапы экстракции ДНК и ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

4.9 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.10 Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

4.11 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.12 Используемые одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с комплектами реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- детектирующий амплификатор ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»);
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- морозильник бытовой;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники для полуавтоматических пипеток вместимостью 1-20 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток вместимостью 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;

- ёмкость для сброса использованных наконечников.
- Программное обеспечение к ДТ-322, ДТ-96:
- Перед началом работы должны быть созданы «Тесты» для каждого исследуемого полиморфизма (см. Приложение, п.1).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Анализируемым материалом являются препараты ДНК человека, полученные из цельной периферической крови.

Взятие цельной периферической крови. Взятие цельной периферической крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2-3 раза после взятия материала.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

Хранение образцов цельной периферической крови. Допускается хранение образцов при температуре 2-8 °С не более 24 ч.

Выделение ДНК. Для получения ДНК из цельной периферической крови рекомендуется использовать комплект реагентов для выделения ДНК «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» или «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА» (производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Комплект «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» рекомендуется использовать в случае, если предполагается длительное хранение выделенной ДНК (до 6 мес.).

ДНК, полученная с использованием комплекта «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА», хранится не более 1 мес.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Внимание! Одновременно с исследованием неизвестных образцов необходимо провести исследование положительных контрольных образцов (3 наименования на каждый полиморфизм) и отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. Инструкции к комплектам реагентов для выделения ДНК «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» или «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА»), а

7.1.1 Промаркировать необходимое количество пробирок для амплификации объемом 0,2 мл (количество анализируемых образцов + 2 пробирки для положительных контрольных образцов + 2 пробирки для отрицательного контрольного образца «К-», умноженное на количество определяемых генетических полиморфизмов).

7.1.2 Встряхнуть пробирки со смесью для амплификации в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге/вортексе.

7.1.3 Внести в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации.

7.1.4 Встряхнуть пробирки с ПЦР-буфером и Taq-АТ-полимеразой в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге/вортексе.

Внимание! Taq-АТ-полимеразу следует доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.1.5 Приготовить в отдельной пробирке смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы:

10х(N+1) мкл ПЦР-буфера

0,5х(N+1) мкл Taq-АТ-полимеразы

где N – количество промаркированных пробирок (п.8.1) с запасом на один образец.

Закрыть крышку пробирки, встряхнуть пробирку в течение 3-5 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге/вортексе.

Внимание! Смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы следует готовить непосредственно перед использованием, смесь хранению не подлежит.

7.1.6 Добавить в каждую пробирку со смесью для амплификации (п. 8.3) по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы.

7.1.7 Добавить в каждую пробирку по 1 капле (20 мкл) минерального масла, закрыть крышки пробирок.

7.1.8 Перенести пробирки в рабочую зону, предназначенную для выделения ДНК.

7.1.9 Добавить в соответствующие пробирки по 5,0 мкл анализируемого препарата ДНК, закрыть крышки пробирок.

Внимание! Во избежание контаминации следует вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольными барьерами.

7.1.10 Добавить в пробирки, предназначенные для положительных контрольных образцов по 5,0 мкл соответствующих K⁺, закрыть крышки пробирок.

Внимание! Во избежание контаминации следует вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольными барьерами.

7.1.11 Добавить в пробирки «К-» 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.1.12 Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1-3 с.

7.2.13 Установить пробирки в блок детектирующего амплификатора.

7.2.14 Заполнить протокол (с использованием соответствующего «Теста» для каждого определяемого полиморфизма) в программном обеспечении к прибору.

При создании параметра «Тест» использовать температуры плавления продуктов амплификации и генотипы, приведенные в таблице 2.

Таблица 2. Генотипы и температуры плавления продуктов амплификации для комплекта реагентов ОнкоГенетика

Полиморфизм	Гомозигота FAM/FAM			Гомозигота HEX/HEX			Гетерозигота		
	Генотип	FAM, °C	HEX, °C	Генотип	FAM, °C	HEX, °C	Генотип	FAM, °C	HEX, °C
BRCA1: 185delAG	NN	56,0	49,0	DelDel	44,0	57,5	NDel	55,0	56,5
BRCA1: 4153delA	NN	53,0	46,0	DelDel	46,0	52,0	NDel	52,5	52,0
BRCA1: 5382insC	NN	52,5	41,0	InsIns	46,5	52,5	NIns	52,0	50,5
BRCA1: 3819delGTAAA	NN	54,5	42,0	DelDel	37,0	52,5	NDel	54,5	52,5
BRCA1: 3875delGTCT	NN	60,0	49,5	DelDel	50,0	56,5	NDel	60,0	56,5
BRCA1: 300T>G (Cys61Gly)	TT	58,0	45,5	GG	54,5	59,0	TG	57,5	58,5
BRCA1: 2080delA	NN	51,5	47,0	DelDel	45,0	52,0	NDel	51,5	52,0
BRCA2: 6174delT	NN	51,5	41,0	DelDel	41,0	50,0	NDel	51,0	49,0

7.1.15 Закрывать блок детектирующего амплификатора и запустить программу, приведенную в таблице 3.

Таблица 3. Программа амплификации для детектирующего амплификатора

ДТ-322 и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Температура	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	2	0	1		Цикл
	94	5	0			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	10			
	67	0	5			
3	94	0	5	45		Цикл
	64	0	15			
4	25	0	30	1		Цикл
5*	25	0	15	50	V	Кривая плавления (указать параметры: $\Delta t = 1^\circ \text{C}$, $T_{\text{кон.}} = 75^\circ \text{C}$)
6	10	...	...	хранение		Хранение

- - При создании блока 5 отметить тип «Кривая плавления»

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2-8 °С в течение 24 часов.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации производится с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322 и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»).

8.2. Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322 и для ДТ-96).

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Учет результатов ПЦР осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 В двух пробирках с К+ для каждого генетического полиморфизма, прошедших ПЦР, программа определяет генотип исследуемого образца, который отображен в таблице 4 в графе «Анализ полиморфизмов». В образцах ДНК, прошедших ПЦР, программа определяет генотип исследуемого образца, который отображен в таблице 4 в графе «Анализ полиморфизмов».

Таблица 4. Отчет по результатам анализа ПЦР.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Анализ полиморфизмов		Tm Fam	Tm Hex
C3	K+1 (BRCA 185delAG)	n	n	57,0	49,1
C4	K+2 (BRCA 185delAG)	n	del	56,0	56,7
C5	K- (вода) (BRCA 185delAG)	?	?		
C6	K- (вода) (BRCA 185delAG)	?	?		
C7	K+1 (BRCA 4153delA)	n	n	52,6	45,6
C8	K+2 (BRCA 4153delA)	n	del	52,5	52,0
C9	K- (вода) (BRCA 4153delA)	?	?		
C10	K- (вода) (BRCA 4153delA)	?	?		
D3	K+1 (BRCA 5382insC)	n	n	53,0	41,5
D4	K+2 (BRCA 5382insC)	n	ins	52,2	51,1
D5	K- (вода) (BRCA 5382insC)	?	?		
D6	K- (вода) (BRCA 5382insC)	?	?		
D7	K+1 (BRCA 3819delGTAAA)	n	n	54,2	42,2
D8	K+2 (BRCA 3819delGTAAA)	n	del	54,2	52,4
D9	K- (вода) (BRCA 3819delGTAAA)	?	?		
D10	K- (вода) (BRCA 3819delGTAAA)	?	?		
E3	K+1 (BRCA 3875delGTCT)	n	n	60,2	50,0
E4	K+2 (BRCA 3875delGTCT)	n	del	59,9	56,7
E5	K- (вода) (BRCA 3875delGTCT)	?	?		
E6	K- (вода) (BRCA 3875delGTCT)	?	?		
E7	K+1 (BRCA 300T>G)	T	T	58,3	45,4
E8	K+2 (BRCA 300T>G)	T	G	57,6	58,2
E9	K- (вода) (BRCA 300T>G)	?	?		
E10	K- (вода) (BRCA 300T>G)	?	?		
F3	K+1 (BRCA 2080delA)	n	n	51,3	46,9
F4	K+2 (BRCA 2080delA)	n	del	50,8	52,2
F5	K- (вода) (BRCA 2080delA)	?	?		
F6	K- (вода) (BRCA 2080delA)	?	?		
F7	K+1 (BRCA 6174delT)	n	n	51,3	40,9
F8	K+2 (BRCA 6174delT)	n	del	50,2	48,6
F9	K- (вода) (BRCA 6174delT)	?	?		
F10	K- (вода) (BRCA 6174delT)	?	?		

9.3. Программа определяет сомнительный результат в следующих случаях:

- в образцах, не прошедших ПЦР,
- в образцах с недостаточным количеством ДНК,
- при значительных отличиях полученной температуры плавления продуктов амплификации от заданной.

Следует повторить ПЦР для подобных образцов.

9.4 В отрицательных контрольных образцах должен регистрироваться сомнительный результат. При получении положительного результата (определение генотипа) для отрицательных контрольных образцов «К-», результаты всей постановочной серии бракуют.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Срок годности наборов - 6 мес. с даты приемки ОТК предприятия-изготовителя.

10.2 Смесь для амплификации, ПЦР-буфер и минеральное масло следует хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

10.3 Taq-АТ-полимеразу следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

10.4 Транспортирование комплектов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

10.5 Комплект с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.6 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

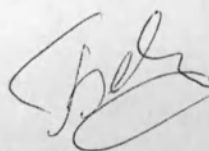
Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплектов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом ПЦР (ОнкоГенетика), следует обращаться по адресу:

117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, 11 этаж,
телефон/факс (495) 980-45-55.

Научный сотрудник

ООО «НПО ДНК-Технология»



Е.И.Батенева

«29» августа 2011 г