

УТВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор

от _____ 200__ г № _____

ЗАО «ДНК-Технология»

Д.Ю.Трофимов

_____ 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**к набору реагентов для определения генетических полиморфизмов,
ассоциированных с нарушениями обмена веществ, методом полимеразной
цепной реакции (Генетика Метаболизма)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов Генетика Метаболизма предназначен для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена веществ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в препаратах ДНК человека, полученных из цельной периферической крови.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип действия набора.

В основе работы комплекта реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся



циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) комплементарных специфическому участку ДНК и последующей достройке 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) Генетика Метаболизма Фолатов. Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла, методом ПЦР в режиме реального времени, включающий:

- смеси для амплификации (4 наименования) – по 1 пробирке каждого наименования (по 960 мкл):

1. MTHFR: 677 C>T (Ala222Val)

2. MTHFR: 1298 A>C (Glu429Ala)

3. MTR: 2756 A>G (Asp919Gly)

4. MTRR: 66 A>G (Ile22Met);

- ПЦР-буфер – 4 пробирки (по 480 мкл);
- Taq-АТ-полимераза – 4 пробирки (по 24 мкл);
- минеральное масло – 4 пробирки (по 960 мкл).

б) Генетика Метаболизма и Энергии. Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями энергетического обмена, методом ПЦР в режиме реального времени, включающий:

- смеси для амплификации (4 наименования) – по 1 пробирке каждого наименования (по 960 мкл):

1. NPY: A>G (Leu7Pro)
2. FTO: T>A (IVS1)
3. FTO: C>A
4. KCNJ11: C>T (Glu23Lys);

- ПЦР-буфер – 4 пробирки (по 480 мкл);
- Taq-АТ-полимераза – 4 пробирки (по 24 мкл);
- минеральное масло – 4 пробирки (по 960 мкл).

в) Генетика Метаболизма Липидов. Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями липидного обмена, методом ПЦР в режиме реального времени, включающий:

- смеси для амплификации (9 наименований) – по 1 пробирке каждого наименования (по 960 мкл):

1. SREBF2: 1784 G>C (Ala595Gly)
2. LPL: 1595 C>G (S447X)
3. LPL: A>G (Asn291Ser)
4. APOE: T>C (Cys112Arg)
5. APOE: T>C (Cys158Arg)
6. CETP: -1337 C>T
7. CETP: -629 C>A
8. LPA: T>C (Ile4399Met)
9. ABCA1: 1051 G>A (Arg 219 Lys);

- ПЦР-буфер – 9 пробирок (по 480 мкл);
- Taq-АТ-полимераза – 9 пробирок (по 24 мкл);

- минеральное масло – 9 пробирок (по 960 мкл).

г) Генетика Метаболизма Углеводов. Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями углеводного обмена, методом ПЦР в режиме реального времени, включающий:

- смеси для амплификации (6 наименований) – по 1 пробирке каждого наименования (по 960 мкл):

1. PPARG: 34 C>G (Pro12Ala)
2. PPARGC1A: G>A (Gly482Ser)
3. PPARGC1B: G>C (Ala203Pro)
4. PPARA: 2528 G>C (c.IVS7)
5. PPARD: 294 T>C
6. PPARG: 34 C>G (Pro12Ala);

- ПЦР-буфер – 6 пробирок (по 480 мкл);

- Taq-АТ-полимераза – 6 пробирок (по 24 мкл);

- минеральное масло – 6 пробирок (по 960 мкл).

д) Генетика Метаболизма Кальция. Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена кальция, методом ПЦР в режиме реального времени, включающий:

- смеси для амплификации (1 наименование) – 1 пробирка (960 мкл):

1. VDR: A>G (BsmI);

- ПЦР-буфер – 1 пробирка (480 мкл);

- Taq-АТ-полимераза – 1 пробирка (24 мкл);

- минеральное масло – 1 пробирка (960 мкл).

е) Генетика Метаболизма Лактозы. Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена лактозы, методом ПЦР в режиме реального времени, включающий:

- смеси для амплификации (2 наименования) – по 1 пробирке каждого наименования (по 960 мкл):

1. MCM6: -13910 T>C
2. MCM6: -22018 T>C;

- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 480 мкл);

- Taq-АТ-полимераза – 2 пробирки (по 24 мкл);

- минеральное масло – 2 пробирки (по 960 мкл);

ж) ПК Метаболизм Фолатов. Комплект положительных контрольных образцов – 12 пробирок (по 50 мкл) - по 3 вида положительного контрольного образца на каждый определяемый полиморфизм:

Полиморфизм	Название положительного контрольного образца		
	Гомозигота FAM/FAM	Гомозигота HEX/HEX	Гетерозигота
MTHFR: 677 C>T (Ala222Val)	K+ CC	K+ TT	K+ CT
MTHFR: 1298 A>C (Glu429Ala)	K+ AA	K+ CC	K+ AC
MTR: 2756 A>G (Asp919Gly)	K+ AA	K+ GG	K+ AG
MTRR: 66 A>G (Ile22Met)	K+ AA	K+ GG	K+ AG

з) ПК Метаболизм и Энергия. Комплект положительных контрольных образцов - 27 пробирок (по 50 мкл) - по 3 вида положительного контрольного образца на каждый определяемый полиморфизм:

Полиморфизм	Название положительного контрольного образца		
	Гомозигота FAM/FAM	Гомозигота HEX/HEX	Гетерозигота
NPY: A>G (Leu7Pro)	K+ AA	K+ GG	K+ AG
FTO: T>A (IVS1)	K+ TT	K+ AA	K+ TA
FTO: C>A	K+ CC	K+ AA	K+ CA
KCNJ11: C>T (Glu23Lys)	K+ CC	K+ TT	K+ CT

и) ПК Метаболизм Липидов. Комплект положительных контрольных образцов - 27 пробирок (по 50 мкл) - по 3 вида положительного контрольного образца на каждый определяемый полиморфизм:

Полиморфизм	Название положительного контрольного образца
-------------	--

	Гомозигота FAM/FAM	Гомозигота HEX/HEX	Гетерозигота
SREBF2: 1784 G>C (Ala595Gly)	K+ GG	K+ CC	K+ GC
LPL: 1595 C>G (S447X)	K+ CC	K+ GG	K+ CG
LPL: A>G (Asn291Ser)	K+ AA	K+ GG	K+ AG
APOE: T>C (Cys112Arg)	K+ TT	K+ CC	K+ TC
APOE: T>C (Cys158Arg)	K+ TT	K+ CC	K+ TC
CETP: -1337 C>T	K+ CC	K+ TT	K+ CT
CETP: -629 C>A	K+ CC	K+ AA	K+ CA
LPA: T>C (Ile4399Met)	K+ TT	K+ CC	K+ TC
ABCA1: 1051 G>A (Arg 219 Lys)	K+ GG	K+ AA	K+ GA

к) ПК Метаболизм Углеводов. Комплект положительных контрольных образцов - 27 пробирок (по 50 мкл) - по 3 вида положительного контрольного образца на каждый определяемый полиморфизм:

Полиморфизм	Название положительного контрольного образца		
	Гомозигота FAM/FAM	Гомозигота HEX/HEX	Гетерозигота
PPARG: 34 C>G (Pro12Ala)	K+ CC	K+ GG	K+ CG
PPARGC1A: G>A (Gly482Ser)	K+ GG	K+ AA	K+ GA
PPARGC1B: G>C (Ala203Pro)	K+ GG	K+ CC	K+ GC
PPARA: 2528 G>C (c.IVS7)	K+ GG	K+ CC	K+ GC
PPARD: 294 T>C	K+ TT	K+ CC	K+ TC

л) ПК Метаболизм Кальция. Комплект положительных контрольных образцов - 3 пробирки (по 50 мкл) - по 3 вида положительного контрольного образца на каждый определяемый полиморфизм:

Полиморфизм	Название положительного контрольного образца		
	Гомозигота FAM/FAM	Гомозигота HEX/HEX	Гетерозигота
VDR: A>G (BsmI)	K+ AA	K+ GG	K+ AG

м) ПК Метаболизм Лактозы. Комплект положительных контрольных образцов - 6 пробирок (по 50 мкл) - по 3 вида положительного контрольного образца:

Полиморфизм	Название положительного контрольного образца		
	Гомозигота FAM/FAM	Гомозигота HEX/HEX	Гетерозигота
MCM6: -13910 T>C	K+ TT	K+ CC	K+ TC
MCM6: -22018 T>C	K+ TT	K+ CC	K+ TC

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