

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «НПФ ДНК-Технология»



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
для определения делеций AZF локуса
методом ПЦР в режиме реального времени
(Генетика наследственных заболеваний. Делеции AZF локуса)**

Мужское бесплодие – нарушение мужской репродуктивной функции, выражающееся в неспособности мужчины иметь потомство. Согласно **письму МЗ РФ от 11 апреля 2003 № 2510/3797-03-32** среди факторов, приводящих к мужскому бесплодию, выделяют генетические факторы, для выявления которых рекомендуется генетическая диагностика.

Наиболее часто встречающиеся генетические факторы, способные приводить к мужскому бесплодию - это делеции Y-хромосомы в регионе, названном «фактор азооспермии» (AZF). Следует учитывать, что микроделеции в локусах AZF – это делеции, не выявляемые с помощью цитогенетического анализа, но они могут приводить к широкому спектру нарушений фертильности у мужчин: от легкого снижения количества сперматозоидов до полного отсутствия половых клеток в семенных канальцах (синдром «только клетки Сертоли»). Делеции AZF-локуса стоят на втором месте по частоте встречаемости среди всех генетических причин мужского бесплодия (после нарушений кариотипа). Микроделеции локуса хромосомы Y обнаруживаются в среднем в 10-15% случаев азооспермии и в 5-10% случаев олигозооспермии тяжелой степени.

По данным литературы микроделеции локуса AZF Y-хромосомы встречаются с частотой примерно 1 на 1000—1500 мужчин [1]. Однако, в группе мужчин с нарушением сперматогенеза их обнаруживают гораздо чаще - в среднем у 10—12% мужчин с азооспермией и у 8—9% мужчин с олигозооспермией тяжелой степени [2; 3; 4].

Локус AZF условно разделен на три субрегиона: AZFa, AZFb и AZFc. В каждом субрегионе локализованы гены, вовлеченные в контроль сперматогенеза. Делеции, имеющие клинические проявления в виде тяжелой олигозооспермии и азооспермии, могут затрагивать 1 или более локусов AZF. Для проведения молекулярно-генетического исследования руководство «EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013»[5], рекомендует использовать определенные STS-маркеры (sequence-tagged sites – высококонсервативные уникальные последовательности ДНК), локализованные на длинном плече Y-хромосомы в различных областях AZF-локуса. **Отсутствие у пациента какого-либо маркера или группы**

керо́в свидетельствует о делеции соответствующей области AZF-локуса. При этом, например, считается, что даже одного непалиморфного STS-маркера достаточно для идентификации делеции в субрегионе, но увеличение количества маркеров повышает точность диагностики и поэтому рекомендуется использование хотя бы двух маркеров.

В тоже время ряд маркеров (таких как sY254 и sY255) жестко сцеплены и/или локализованы в разных областях Y-хромосомы. Т.о., при клинической интерпретации полученных данных, необходимо рассматривать не наличие или отсутствие конкретного маркера, а наличие микроделеций определенного локуса, картированного соответствующими STS-маркерами.

Субрегион AZFa содержит три гена - UTY, USP9Y и DBY. В случае делеции генов USP9Y и DBY у мужчин диагностируют азооспермию с синдромом «только клетки Стертоли», соответственно, при полной делеции всего локуса наблюдается тот же феномен. Данный субрегион не содержит повторяющихся последовательностей и его делеции встречаются с низкой частотой (примерно 5% от всех микроделеций Y-хромосомы) [6]. Маркеры, позволяющие выявлять делеции этого субрегиона, имеют обозначения sY84, sY86 и sY615.

Субрегион AZFb содержит последовательности, представленные как в одной копии, так и высокоповторяющиеся прямые и инвертированные палиндромные последовательности. В данном субрегионе картирован ген RBMY, который является высококопийным геном (от 30 до 40 копий), при этом некоторые из этих копий являются псевдогенами. Делеции одной копии или нескольких копий гена RBMY выявляются у мужчин с азооспермией или тяжелой олигозооспермией. Делеции локуса AZFb встречаются с частотой примерно 15-20% среди всех микроделеций Y-хромосомы [4]. В регионе AZFb локализованы маркеры: sY127, sY134, sY142.

Несмотря на редкость встречаемости делеций регионов AZFa и AZFb, клиническая значимость их определения такова, что ЕАА и Европейские стандарты качества молекулярно – генетических исследований (the European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)) обязывают включать не меньше двух маркеров для каждого из этих регионов в тест-системы для молекулярно – генетической диагностики мужского бесплодия [2].

Делеции субрегиона AZFc встречаются чаще всего (до 70% всех микроделеций Y-хромосомы). Протяженность данного субрегиона составляет примерно $3,5 \cdot 10^6$ нуклеотидных пар и состоит в основном из блоков высокоповторяющихся последовательностей, которые организованы в палиндромные структуры, часто подвергающиеся делециям [7].

В этом участке находится семейство генов DAZ (Deleted in Azoospermia, гены, делетированные при азооспермии) представленное несколькими различными генами. У мужчин при сохранении двух DAZ-генов нарушения спермограммы менее выражены, чем у пациентов, у которых отсутствуют все четыре гена. В локусе AZFc определяются маркеры sY1197, sY254, sY1291, sY242, sY255, sY1206, sY1125.

По данным литературы имеется генофенотипические корреляции между делециями в определенном регионе локуса AZF и нарушениями сперматогенеза. Чаще всего встречаются делеции в регионе AZFc, однако они приводят к широкому спектру нарушений: от азооспермии до олигозооспермии легкой степени.

ичные делеции этого региона встречаются и у фертильных мужчин. Делеции в локах AZFa (маркеры sY84, sY86 и sY615) и AZFb (маркеры sY127, sY134 и sY142) ведут к тяжелым нарушениям сперматогенеза – синдрому «только клетки Сертоли», котором сперматогенез блокируется на ранних стадиях и встречается у 1-2% мужчин с тяжелыми нарушениями сперматогенеза - необструктивной азооспермией. У фертильных пациентов такие делеции не встречаются.

Среди определяемых маркеров есть несколько групп, связанных жестким сцеплением:

- sY84, sY86,
- sY127, sY134,
- sY254 и sY255

Делеция только одного маркера из группы практически не встречается. Каждый случай, когда определяется делеция только одного из двух маркеров, должен, в первую очередь рассматриваться как ПЦР – артефакт и требует повторения исследования [5].

Использованная литература

1. Черных В.Б., Чухрова, А.Л., Бескоровайная, Т.С. и др. Типы делеций Y-хромосомы и их частота у мужчин с бесплодием. // Генетика. - 2006. - Vol. 42:8:1130-1136.
2. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004 // Int J Androl. - 2004. - Vol. 27. - №4. - P. 240-249.
3. Foresta C., Ferlin A., Gianaroli L., Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples // Eur J Hum Genet. - 2002. - Vol. 10. - №5. - P. 303-312.
4. Курило Л. Ф.Y-хромосома, AZF-микроделеции и идиопатическое бесплодие у мужчин (обзор литературы). // Проблемы репродукции 2001 - Т.№5
5. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tuttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 // Andrology. - 2014. - Vol. 2. - №1. - P. 5-19.
6. Silber S. J., Repping S. Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome // Hum Reprod Update. - 2002. - Vol. 8. - №3. - P. 217-229.
7. Navarro-Costa P., Goncalves J., Plancha C. E. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility // Hum Reprod Update - Vol. 16. - №5. - P. 525-542.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Генетика наследственных заболеваний. Делеции AZF локуса» предназначен для выявления микроделений Y-хромосомы, ассоциированных с азооспермией, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

1. Принцип действия

Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, включающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта (в зависимости от вида фасовки – использование парафина для разделения реакционных слоёв или использование Taq-полимеразы с антительным «горячим стартом»).

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Исследование с использованием набора реагентов «Делеции AZF локуса» состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК в режиме реального времени.

Набор реагентов «Делеции AZF локуса» включает: смеси для амплификации, специфичные для маркеров Y-хромосомы, делеции которых являются причиной азооспермии или олигозооспермии; смесь для амплификации ДНК гена, ассоциированного с мужским полом (SRY) и смесь для амплификации геномной ДНК человека, предназначенную для контроля взятия клинического материала (КВМ). КВМ и SRY используются для исключения ошибок преаналитического этапа. В случае недостаточного для анализа количества забранного материала требуется повторное взятие клинического материала.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации искомой ДНК, включены флуоресцентные метки Fam и Hex. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации гена, ассоциированного с

ским полом (SRY), входит флуоресцентный краситель Fam, для контроля взятия материала –Hex (таблица 1).

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В одну из пробирок (таблица 1) добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения амплифицированных пробирок (стрипов) в плашке. После прохождения амплификации программа сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие со специальным программным обеспечением.

Таблица 1

Состав стрипов «Делеции AZF локуса», цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки	Канал детекции			Цвет буфера	Цвет парафина
	Fam	Hex	Rox		
1	sY134	sY242	-	Голубой	Белый
2	sY142	sY255	-	Бесцветный	
3	sY615	sY254	-		
4	sY1125	sY84	-		
5	sY1197	sY86	Маркер		
6	sY1206	sY127	-		
7	sY1291	-	-		
8	SRY	KBM	-		

2.2. Набор в стандартной комплектации рассчитан на проведение 24 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительного контрольного образца и отрицательного контрольного образца. По запросу потребителей возможна фасовка, рассчитанная на другое количество определений

2.3. Состав набора

Набор выпускается в стандартной комплектации, также допускается оптовая фасовка реагентов для крупных лабораторий, фасовка для автоматических раскапывающих станций, в т.ч. для использования в пакетных исследованиях.

В состав набора входят следующие компоненты:

- специфичные для делеций AZF локуса смеси для амплификации,
- положительный контрольный образец,
- вспомогательные реагенты.

Полный перечень делеций AZF локуса, выявляемых набором, приведен в таблице 1.

Набор реагентов для определения делеций AZF локуса методом полимеразной цепной реакции «Генетика наследственных заболеваний. Делеции AZF локуса» включает следующие варианты фасовок:

Таблица 2.

ВАРИАНТЫ ФАСОВОК РЕАГЕНТОВ

Реагент	Стандартная комплектация (на 24 определения)	Сокращенная комплектация* (фасовка на одно наименование на 48 определений)	Фасовка для автоматических раскапывающих станций, в т.ч. для пакетных исследований**
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	24 стрипа (по 8 пробирок) по 20 мкл	48 пробирок или 6 стрипов по 8 пробирок	отсутствует
Смесь для амплификации Стрим	отсутствует	отсутствует	2 стрипа (по 8 пробирок) по 140 мкл
ПЦР-буфер Стрим	отсутствует	отсутствует	1 пробирка (1280 мкл)
Taq-АТ-полимераза Или	отсутствует	отсутствует	1 пробирка (120 мкл)
раствор Taq-полимеразы	4 пробирки (по 500 мкл)	1 пробирка (500 мкл)	отсутствует
Минеральное масло	4 пробирки (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)	отсутствует
Буфер для разведения ДНК	отсутствует	отсутствует	3 пробирки (по 1080 мкл)
Положительный контрольный образец	1 пробирка (150 мкл)	1 пробирка (75 мкл)	1 пробирка 60 мкл
Отрицательный контрольный образец (по запросу)	1 пробирка (150 мкл)	1 пробирка (75 мкл)	1 пробирка 60 мкл

* - по запросу потребителей допускается комплектация сокращенного количества смесей для амплификации (менее 14 наименований) с соответствующей маркировкой упаковки.

** - приведена фасовка для раскапывания с использованием автоматической раскапывающей станции ДТстрим (ООО «НПО ДНК-Технология») для дальнейшего проведения ПЦР на амплификаторе ДТпрайм (на 384 лунки) (ООО «НПО ДНК-Технология»)

2.4. Время проведения анализа – от 2,5 ч (с учётом пробоподготовки).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Специфичность анализа

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Список выявляемых набором маркеров представлен в таблице 1.

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации программное обеспечение для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 проводит анализ количества ДНК человека и при достаточном для исследования количестве (не менее 1,0 нг на пробирку) определяет генотип исследуемого образца.

Для образцов биологического материала, содержащих выявляемые специфичные маркеры, во время проведения амплификации амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке по соответствующим каналам детекции.

Для образцов биологического материала, не содержащих выявляемые специфичные маркеры, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке по соответствующим каналам детекции отсутствует.

2. Контроль взятия материала

3.2.1. Геномная ДНК человека

Для образцов биологического материала, в которых присутствует геномная ДНК человека, детектирующий амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке (КВМ).

Для образцов биологического материала, в которых отсутствует геномная ДНК человека, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке отсутствует (КВМ).

3.2.2. Контроль принадлежности к мужскому полу

Для образцов биологического материала, принадлежащих мужчине, амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке (SRY).

Для образцов биологического материала, принадлежащих женщине, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке (SRY) отсутствует.

3.3. Чувствительность

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует $C_p \leq 32,0$ на канале детекции КВМ (Hex) в соответствующей пробирке после проведения амплификации. При использовании меньшего количества ДНК ($C_p > 32,0$ на канале детекции КВМ (Hex)) производитель не гарантирует корректную работу набора.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (п.п.9.3.5, 9.3.6 Приказа Минздрава России от 06.06.2012 N 4н).

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и

удителями паразитарных болезней», методических указаний 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 с набором следует соблюдать требования ГОСТ 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

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

Утилизировать неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов «Делеции AZF локуса» требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий со специализированным программным обеспечением;
- автоматическая раскапывающая станция (*при использовании фасовки для APC*);
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл;
- пробирки вместимостью 200 мкл стрипованные по 8 шт. (*при использовании фасовки для APC*);
- крышки для пробирок стрипованных станция (*при использовании фасовки для APC*);
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб (производство ООО «НПО ДНК-Технология»);
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-МЧ, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

- файл с параметрами анализа «AZF.ini».

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

Взятие цельной периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта натриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 /мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для размешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

2. Транспортировка и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре 2–8°C не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре минус 20°C в течение 1 месяца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуются комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-МЧ, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА.

Комплект ПРОБА-МЧ, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА рекомендуется использовать в случае, если предполагается длительное хранение выделенной ДНК (до 6 месяцев). ДНК, полученную с использованием комплекта ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, следует хранить не более одного месяца.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с набором для определения делеций AZF локуса методом ПЦР в режиме реального времени можно узнать у представителя компании.

Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объеме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции (стандартная комплектация набора).

Промаркируйте по одному стрипу с запечатанной парафином смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца («К-») и положительного контрольного образца («К+»).

внимание. Один стрип рассчитан на исследование одного образца.

Пример, необходимо проанализировать два образца. Нужно промаркировать 2 стрипа исследуемых образцов, один для «К-» и один для «К+». Общее количество стрипов 4 (таблица 2).

Таблица 3

Пример маркировки стрипов для проведения ПЦР

Образец 1	Пробирки 1 – 8
Образец 2	Пробирки 1 – 8
«К-»	Пробирки 1 – 8
«К+»	Пробирки 1 – 8

7.2.2. Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

7.2.3. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

7.2.4. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.5. Внесите в каждую пробирку стрипов для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК (один стрип для каждого образца).

7.2.6. Внесите в каждую пробирку стрипа, маркированного «К-», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. п.7.1). Внесите в каждую пробирку стрипа, маркированного «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0мкл положительного контрольного образца.

7.2.7. Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.

7.2.8. Установите все стрипы в амплификатор детектирующий. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.9. Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «AZF.ini». При последующих постановках

добавьте в протокол тест «AZF», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

(**Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции (фасовка для автоматических раскапывающих станций).**

Для автоматического раскапывания реагентов и образцов с помощью APC необходимо подготовить реагенты и образцы и разместить их на столе APC.

1.1. **Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим с Taq-АТ-полимеразой:**

В пробирку с ПЦР-буфером Стрим добавьте весь объём пробирки с Taq-полимеразой.

1.2. Встряхните пробирку со смесью в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

ВНИМАНИЕ!Смесь ПЦР-буфера Стрим и Taq-АТ-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием.

1.3.3. Внести в 8 пробирок нового пустого стрипа по 140 мкл полученной смеси.

1.3.4. Центрифугируйте стрип на микроцентрифуге.

1.3.5. Поместите стрип на рабочий стол APC в соответствии со схемой на вкладыше.

1.3.6. Центрифугируйте **стрипы со смесями для амплификации Стрим.**

1.3.7. Поместите стрипы со смесями для амплификации Стрим на рабочий стол APC в соответствии со схемой на вкладыше.

1.3.8. Откройте стрипы со смесью для амплификации.

1.3.9. Промаркируйте пустые **стрипы для образцов ДНК** (по одной пробирке стрипа для каждого образца, включая положительный и отрицательный контрольные образцы).

1.3.10. Внесите в пустые стрипы в соответствующие пробирки по 120 мкл выделенной ДНК, положительного контрольного образца, отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! При выделении ДНК с использованием комплекта реагентов «Проба-Рapid» и «Проба-ГС-ПЛЮС» полученный препарат ДНК следует развести: 30 мкл образца ДНК + 90 мкл Буфера для разведения ДНК. Таким же образом необходимо развести положительный контрольный образец.

1.3.11. Центрифугируйте стрипы с препаратами ДНК на центрифуге.

1.3.12. Поставьте два новых пустых стрипа на рабочий стол APC.

3. Запустите программу раскапывания APC.
4. После окончания раскапывания запечатайте плашку 384 на ламинаторе ДТпак в соответствии с инструкцией к прибору.
15. Поместите плашку 384 в детектирующий амплификатор.
16. Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «AZF.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «AZF», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляются амплификатором детектирующим автоматически.

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (Cp), результат по каждому исследованию (качественный анализ).

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1. Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.
- 9.2. После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.
- 9.3. В результатах анализа необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ). Значение КВМ по Cp больше 32,0 следует интерпретировать как недостаточное количество материала (см. п. 3.2). В этом случае требуется повторное взятие клинического материала.

Таблица 4.

Интерпретация результатов ПЦР

Результат (Ср)	Результат (Качественный)	Интерпретация результата
Выявление микроделений sY134 - sY1291		
$Cp \leq 37,0$	«Норма»	Отсутствие делеции
$Cp > 37,0$	«нд»	Сомнительный результат
Ср не указан	«Делеция»	Наличие делеции
Контроль принадлежности к мужскому полу (SRY)		
$Cp \leq 37,0$	«+»	Обнаружен ген SRY, ассоциированный с мужским полом
$Cp > 37,0$	«нд»	Сомнительный результат
Ср не указан	«-»	Не обнаружен ген SRY, ассоциированный с мужским полом

Внимание! При получении сомнительного результата требуется повторное проведение амплификации, при получении такого же результата снова - повторное взятие клинического материала.

9.5. Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты:

Таблица 5.

Результаты исследования отрицательного и положительного контрольных образцов

	Исследование	Ср	Результат
«К-»	sY134 - sY1291	Ср не указан	«Делеция»
	SRY		
	KBM		
«К+»	sY134 - sY1291	Ср указан	«Норма»
	SRY		
	KBM		

9.6. При получении положительных значений для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом

случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

При получении отрицательных значений для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 1.1. Срок годности набора – 9 месяцев с даты изготовления.
- 1.2. Все компоненты наборы, кроме Taq-АТ-полимеразы, следует хранить при температуре 2–8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности.
- 1.3. Taq-АТ-полимеразу следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.
- 1.4. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.
- 10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.6. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора **Генетика наследственных заболеваний. Делеции AZF локуса**, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6,

Тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>

«Согласовано»

Директор Федерального государственного бюджетного

учреждения «Научный центр акушерства,

гинекологии и перинатологии им. академика

В.И.Кулакова» МЗ РФ

Академик РАН, д.м.н., профессор



Г.Т.Сухих

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА
(EN 980:2008 «Symbols for use in the labeling of medical device»)



Только для in vitro диагностики



Условия хранения (температура)



Количество определений (тестов)



Дата производства



Серия набора



Годен до



Содержит инструкцию по применению



Знак европейской сертификации



Каталожный номер



Адрес производителя

Всего произито, произумеровано
и суренного печатво
15 листов

