

УТВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор

от _____ 2009 г. № _____

ООО «НПО «ДНК-Технология»

Д.Ю. Трофимов

28.09.2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

к набору реагентов для определения генетических полиморфизмов,
ассоциированных с метаболизмом фармацевтических препаратов, методом
полимеразной цепной реакции (ФармакоГенетика)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов ФармакоГенетика предназначен для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом фармацевтических препаратов, методом 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 осуществляется в серии повторяющихся циклов температурной денатурации, 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-мишеню, 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) ФармакоГенетика Варфарин. Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом варфарина, методом ПЦР в режиме реального времени, включающий:

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

1. CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys)
2. CYP2C9: A>C (Ile359Leu)
3. CYP4F2: C>T (Val433Met)
4. VKORC1: -1639 G>A

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

Возможна расфасовка ПЦР-буфера, Таq-АТ-полимеразы и минерального масла в более крупные тары.

б) ПК Варфарин. 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
CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys)	K+ CC	K+ TT	K+ CT
CYP2C9: A>C (Ile359Leu)	K+ AA	K+ CC	K+ AC
CYP4F2: C>T (Val433Met)	K+ CC	K+ TT	K+ CT
VKORC1: -1639 G>A	K+ GG	K+ AA	K+ GA

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 (KBM), производства ООО «НПО ДНК-Технология».

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (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.

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 объемом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объемом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 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 + 3 пробирки для положительных контрольных образцов + пробирку 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

0,5x(N+1) мкл Taq-AT-полимеразы

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

Закрывать 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-AT-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-AT-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 1.

Таблица 1. Генотипы и температуры плавления продуктов амплификации для комплекта реагентов ФармакоГенетика Варфарин

Полиморфизм	Гомозигота FAM/FAM			Гомозигота HEX/HEX			Гетерозигота		
	Генотип	FAM, °C	HEX, °C	Генотип	FAM, °C	HEX, °C	Генотип	FAM, °C	HEX, °C
CYP2C9: 430 C>T (Arg144Gln)	CC	58,8	46,7	TT	51,0	56,0	CT	58,6	56,6
CYP2C9: A>C (Ile359Leu)	AA	57,4	48,4	CC	52,0	59,0	AC	56,6	58,5
CYP4F2: C>T (Val433Met)	CC	58,9	45,5	TT	49,9	55,3	CT	57,8	55,0
VKORC1: -1639 G>A	GG	58,4	52,0	AA	49,9	58,8	GA	58,2	58,4

7.1.15 Закрыть блок детектирующего амплификатора и запустить программу, приведенную в таблице 2.

Таблица 2. 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
	67	0	10			
3	94	0	5	45		Цикл
	67	0	5			
4	25	0	30	1		Цикл
5*	25	0	15	50	V	Кривая плавления (указать параметры: $\Delta t=1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{кон.}}=75\text{ }^{\circ}\text{C}$)
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 образцах ДНК, прошедших ПЦР, программа определяет генотип исследуемого образца, который отображен в таблице в графе «Анализ мутаций»:

9.3 Программа определяет сомнительный результат в следующих случаях:

- в образцах, не прошедших ПЦР,
- в образцах с недостаточным количеством ДНК,
- при значительных отклонениях 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 изготовления.

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-AT-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 метаболизмом фармацевтических препаратов, методом ПЦР (ФармакоГенетика), следует обращаться по адресу:

117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, 11 этаж,

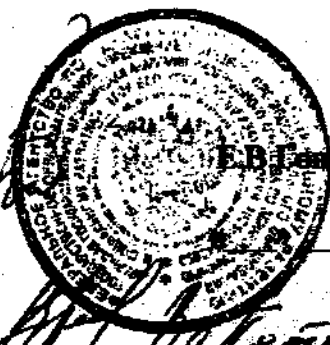
телефон/факс (495) 980-45-55.

Согласовано
Директор лаборатории вирусологии
и иммунологии ГОУ ВПО УИИИ, Росздрава
к.м.н. Воронкина В.С.
28.01.10

Ведущий научный сотрудник

ЗАО «НПО ДНК-Технологии»

Подпись В.С. Воронкина
Заведующий лабораторией
Национального центра
по изучению
Росздрава



Е.В. Гаврилова

2009г