

Приказом Росздравнадзора
от 18.03.2012 № 11.36-Пп/12

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

В.И.Покровский
2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для детекции генетических
полиморфизмов методом пиросеквенирования с применением
системы генетического анализа серии PyroMark

«АмплиСенс® Пироскрин»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	10
СОСТАВ.....	10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	10
А. Подготовка пробирок для амплификации	11
Б. Проведение амплификации.....	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПРОБОПОГОТОВКИ И ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ	12
Прибор PyroMark Q24.....	12
А. Программирование прибора PyroMark Q24	12
Б. Подготовка картриджа	13
В. Подготовка планшета для секвенирования	13
Г. Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию.....	13
Г1. Иммобилизация ПЦР-продукта.....	14
Г2. Пробоподготовка с использованием вакуумной станции	15
Д. Пиросеквенирование ПЦР-продукта.....	16
Прибор PyroMark Q96 MD	17
А. Программирование прибора PyroMark Q96 MD	17
Б. Подготовка картриджа	18
В. Подготовка планшета для секвенирования	19
Г. Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию.....	19
Г1. Иммобилизация ПЦР-продукта.....	19
Г2. Пробоподготовка с использованием вакуумной станции	21
Д. Пиросеквенирование ПЦР-продукта.....	23
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	24
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	25
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ИФА	– иммуноферментный анализ
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления изменений нуклеотидной последовательности в заданных локусах ДНК, которые могут иметь клиническое или эпидемиологическое значение, с использованием методики пиросеквенирующего синтеза. Исследуемые генетические локусы могут объединяться в группы – **профили** генетических исследований. Пиросеквенирующий синтез (пиросеквенирование) – метод определения нуклеотидной последовательности ДНК в режиме «реального времени», основанный на детекции высвобождающегося пирофосфата при элонгации цепи ДНК в ходе синтеза второй цепи ДНК на матрице одноцепочечной ДНК (реакции секвенирующего синтеза). Высвобождающийся пирофосфат проходит серию ферментативных превращений, в результате чего регистрируется хемилюминесцентный сигнал; совокупность сигналов соответствует нуклеотидной последовательности исследуемого генетического локуса.

ВНИМАНИЕ! Результаты исследования клинически значимых генетических полиморфизмов учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Детекция генетических полиморфизмов с помощью методики пиросеквенирования включает в себя четыре этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК исследуемого генетического локуса, процедуру пробоподготовки и постановку реакции пиросеквенирования.

После экстракции ДНК проводится амплификация исследуемого генетического локуса со специфическими праймерами. Для последующей иммобилизации продукта амплификации, содержащего изучаемый полиморфный участок ДНК, и проведения пробоподготовки используется праймер, связанный с биотином. В зависимости от направления секвенирования возможны два типа анализа: прямой анализ (forward analysis) и обратный анализ (reverse analysis). В первом случае биотинилирован

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

обратный праймер для амплификации, во втором – прямой праймер для амплификации.

После проведения ПЦР продукт амплификации связывается с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином, для последующей очистки реакционной смеси и получения одноцепочечного фрагмента ДНК путем проведения серии отмывок с помощью станции для пробоподготовки Vacuum Prep Workstation. Для связывания ампликона используется реагент Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare). После очистки и иммобилизации одноцепочечного ПЦР-продукта проводится определение нуклеотидной последовательности исследуемого генетического локуса в реакции пиросеквенирующего синтеза.

При разработке систем для детекции генетических полиморфизмов, входящих в формы выпуска набора, использованы рекомендации фирмы Qiagen (Германия), обеспечивающие надлежащее качество результатов пиросеквенирования (www.qiagen.com/).

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 25 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов для пробоподготовки «ПИРО-преп». Комплект реагентов предназначен для проведения пробоподготовки к пиросеквенированию с использованием станции Vacuum Prep Workstation.

Форма 2 включает комплект реагентов «ТОНО-скрин» – профиль генетического исследования «Артериальная гипертензия». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к артериальной гипертензии.

Форма 3 включает комплект реагентов «ИБС-скрин» – профиль генетического исследования «Ишемическая болезнь сердца». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к ишемической болезни сердца.

Форма 4 включает комплект реагентов «ЛИПО-скрин-Б» – профиль генетического исследования «Липидный обмен, базовый профиль». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, связанных с обменом липидов.

Форма 5 включает комплект реагентов «ЛИПО-скрин-Д» – профиль генетического исследования «Липидный обмен, дополнительный профиль». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, связанных с обменом липидов.

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЛАЗМО-скрин» – профиль генетического исследования «Плазменные факторы системы свертывания крови». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, кодирующих плазменные факторы системы свертывания крови.

Форма 7 включает комплект реагентов «ФОЛАТ-скрин» – профиль генетического исследования «Фолатный цикл». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, связанных с фолатным циклом.

Форма 8 включает комплект реагентов «ТРОМБО-скрин» – профиль генетического исследования «Агрегационные факторы системы свертывания крови». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, кодирующих агрегационные факторы системы свертывания крови.

Форма 9 включает комплект реагентов «BRCA-скрин» – профиль генетического исследования «Рак молочной железы и/или яичников». Комплект реагентов предназначен для выявления мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированных с повышенным риском развития рака молочной железы и/или яичников.

Форма 10 включает комплект реагентов «ОСТЕО-скрин» – профиль генетического исследования «Остеопороз». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к остеопорозу.

Форма 11 включает комплект реагентов «ДИАБЕТ-1-скрин» – профиль генетического исследования «Сахарный диабет 1-го типа». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к сахарному диабету 1-го типа.

Форма 12 включает комплект реагентов «ДИАБЕТ-2-скрин» – профиль генетического исследования «Сахарный диабет 2-го типа». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к сахарному диабету 2-го типа.

Форма 13 включает комплект реагентов «ДИАБЕТ-2Д-скрин» – профиль генетического исследования «Сахарный диабет 2-го типа, дополнительный профиль». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к сахарному диабету 2-го типа.

Форма 14 включает комплект реагентов «АДИПО-скрин» – профиль генетического исследования «Ожирение». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к ожирению.

Форма 15 включает комплект реагентов «КОЛО-скрин» – профиль генетического исследования «Болезнь Крона». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с предрасположенностью к болезни Крона.

Форма 16 включает комплект реагентов «ФАРМА-скрин-1» – профиль генетического исследования «I фаза биотрансформации, профиль 1». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, влияющих на индивидуальные особенности фармакологического ответа.

Форма 17 включает комплект реагентов «ФАРМА-скрин-2а» – профиль генетического исследования «II фаза биотрансформации, профиль 1». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, влияющих на индивидуальные особенности фармакологического ответа.

Форма 18 включает комплект реагентов «ФАРМА-скрин-2б» – профиль генетического исследования «II фаза биотрансформации, профиль 2». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, влияющих на индивидуальные особенности фармакологического ответа.

Форма 19 включает комплект реагентов «ФАРМА-скрин-транспорт» – профиль генетического исследования «Транспорт лекарств». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, влияющих на индивидуальные особенности фармакологического ответа.

Форма 20 включает комплект реагентов «ФАРМА-скрин-Варфарин» – профиль генетического исследования «Варфарин». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, влияющих на расчет дозы варфарина с помощью Интернет-ресурса www.warfarindosing.org/.

Форма 21 включает комплект реагентов «ФАРМА-скрин-Иматиниб» – профиль генетического исследования «Иматиниб». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с эффективностью терапии иматинибом.

Форма 22 включает комплект реагентов «CCR5del32-скрин» – профиль генетического исследования «CCR5del32». Комплект реагентов предназначен для выявления делеционного полиморфизма в гене CCR5, влияющего на индивидуальные особенности иммунитета.

Форма 23 включает комплект реагентов «СПОРТ-мио-скрин» – профиль генетического исследования «Структура мышц». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с

индивидуальными морфологическими особенностями мышечной ткани и предрасположенностью к типу физической нагрузки.

Форма 24 включает комплект реагентов «СПОРТ-энерго-скрин» – профиль генетического исследования «Энергетический обмен». Комплект реагентов предназначен для выявления генетических полиморфизмов в генах, ассоциированных с индивидуальными особенностями энергетического обмена мышечной ткани и предрасположенностью к типу физической нагрузки.

Форма 25 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для связывания ПЦР-продукта, проведения очистки реакционной смеси и денатурации ампликона с использованием станции для пробоподготовки Vacuum Prep Workstation. Для связывания ПЦР-продукта необходимо использовать дополнительный реагент Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare). Состав формы комплектации 1 и описание входящих в нее реагентов находятся в соответствующем приложении к данной инструкции.

Формы комплектации 2-24 предназначены для проведения амплификации ДНК и постановки реакции пиросеквенирования. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Состав форм комплектаций 2-24 и описание входящих в них генетических локусов находятся в соответствующих приложениях к данной инструкции.

Форма комплектации 25 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 25 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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 возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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 всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНЫ 1, 2. Экстракция ДНК и проведение амплификации

1. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009) или аналогичные.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf, Германия).

6. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
7. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл в штативах.
9. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов). Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), MaxyGene (Axygen, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) или аналогичные).
13. Пластиковая пипетка для минерального масла.

ЗОНА 3. Пробоподготовка и проведение реакции пиросеквенирования

14. Вода H₂O стерильная (флакон 500 мл) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
15. Комплект для пробоподготовки «ПИРО-преп» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
16. Набор реагентов PyroMark Gold Q24 Reagents или PyroMark Gold Q96 Reagents (Qiagen, Германия).
17. Станция для пробоподготовки Vacuum Prep Workstation (Qiagen, Германия).
18. Частицы сефарозы Streptavidin Sepharose High Performance 5 ml (GE Healthcare, США).
19. Прибор для определения нуклеотидной последовательности методом пиросеквенирования PyroMark Q24 или PyroMark Q96 MD (Qiagen, Германия) или аналогичный.
20. Планшеты для пиросеквенирования (Qiagen, Германия).
21. Шэйкер для планшетов со скоростью вращения не ниже 1400 об/мин.
22. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
23. Твердотельный термостат (например, «Биоком», Россия).
24. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
25. Одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл и без фильтра до 200 мкл в штативах.

26. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов). Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

27. «Парафильм» (например, Pechiney Plastic Packaging, США).

28. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

29. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для проведения исследования является цельная кровь.

СОСТАВ

Форма комплектации 1 включает комплект реагентов для пробоподготовки «ПИРО-преп» (см. соответствующее приложение).

Количество исследуемых генетических локусов в формах комплектации 2-24 может варьировать (см. соответствующие приложения). В комплекты реагентов для форм комплектации 2-24 входит разное количество пробирок с реактивами ПЦР-смесь-1 и праймер для секвенирования (в зависимости от количества исследуемых локусов). Количество пробирок с реактивами 2,5x ПЦР-буфер blue, полимеразы (TaqF) и минеральное масло для ПЦР зависит от общего количества ПЦР-реакций, необходимых для анализа всех генетических локусов, входящих в профиль генетического исследования.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (например, «РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»), в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Для экстракции отрицательного контрольного образца в качестве пробы используется реагент ОКО, прилагающийся к комплекту реагентов для проведения амплификации ДНК и постановки реакции пиросеквенирования.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл. Оптимальное количество ДНК – 10-30 нг в реакцию (для приготовления разведений рекомендуется использовать реагент ТЕ-буфер производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы, которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °C в течение 15 мин.

Необходимые реактивы:

ПЦР-смесь-1, 2,5х ПЦР-буфер blue, полимеразы (TaqF), минеральное масло для ПЦР.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Подготовить реакционную смесь для каждого исследуемого полиморфизма. Для проведения **N** реакций смешать в отдельной пробирке **5*(N+1)** мкл соответствующей ПЦР-смеси-1, **10*(N+1)** мкл 2,5х ПЦР-буфера blue и **0,5*(N+1)** мкл полимеразы (TaqF).

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь хранить не более 2 ч.

2. Перемешать смесь на вортексе и раскапать по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР.
- 3.* Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР.
4. В пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб ДНК** в концентрации 1-3 нг/мкл, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
5. В качестве отрицательного контроля анализа по каждому исследуемому генетическому локусу необходимо использовать отрицательный контрольный образец экстракции ДНК (ОКО). Пробу, выделенную из ОКО, следует разбавить в той же пропорции, что и ДНК, экстрагированную из клинических проб.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу амплификации (см. табл. 1).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °C (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 1

Программа амплификации

«Терцик»				Gradient Palm Cyclер, MaxyGene, GeneAmp PCR System 2700		
Цикл	Температура, °C	Время	Циклы	Температура, °C	Время	Циклы
0	95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45	95	15 с	45
	60	10 с		60	15 с	
	72	15 с		72	20 с	
3	72	2 мин	1	72	2 мин	1
4	10	Хранение		10	Хранение	

- По окончании выполнения программы приступить к подготовке продуктов амплификации к пиросеквенированию.

ПРОВЕДЕНИЕ ПРОБОПОГОТОВКИ И ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

Прибор PyroMark Q24

А. Программирование прибора PyroMark Q24

- Запустить программное обеспечение PyroMark Q24.
- Приступить к настройке тестов:
 - в меню **File** выбрать вкладку **New Assay**, в ней выбрать вкладку **AQ Assay**;
 - в строку **Sequence to Analyze** ввести анализируемую последовательность;
 - определить порядок ввода в реакционную смесь нуклеотидов нажатием кнопки **Generate Dispensation Order**;
 - в меню **File** выбрать вкладку **Save as**, задать название теста, сохранить тест и закрыть окно настройки тестов.
- Подготовка анализа – создание шаблона эксперимента:
 - в меню **File** выбрать вкладку **New Run**;
 - в меню **Instrument Method** выбрать **PyroMark Q24 Method 001 Rev. A(1)_1** или метод, указанный в инструкции к набору реагентов **PyroMark Gold Q24 Reagents**;
 - в окне **Plate Setup** для каждой исследуемой ячейки в верхней строке нажатием правой кнопки мыши с помощью опции **Load Assay** ввести тесты для исследуемых образцов;
 - в окне **Plate Setup** во второй и третьей строке нажатием левой кнопки мыши задать параметры исследуемых образцов (названия, примечания);
 - в меню **File** выбрать вкладку **Save As**, задать название анализа, сохранить шаблон эксперимента на электронном носителе (флеш-карте) и закрыть окно настройки тестов.
- В меню **Tools** подготовленного шаблона эксперимента выбрать **Pre Run Information**. В появившемся окне будет указано количество реактивов,

необходимое для проведения анализа. Переписать или распечатать эту информацию для проведения подготовки картриджа.

Б. Подготовка картриджа

Необходимые реактивы:

Набор реагентов PyroMark Gold Q24 Reagents или PyroMark Gold Q96 Reagents (Qiagen), H₂O стерильная (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

ВНИМАНИЕ! Все действия следует осуществлять согласно «Руководству по эксплуатации реагентов PyroMark Gold Q24 Reagents» или «Руководству по эксплуатации реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents».

Программное обеспечение рассчитывает необходимое для анализа количество реактивов: смеси **ферментов** («Е»), **субстратов** («S») и **нуклеотиды** («А», «Т», «С», «G»).

1. Растворить лиофилизированные смеси **ферментов** и **субстратов** в H₂O **стерильная** в соответствии с руководством к соответствующему набору реагентов;
2. Внести в соответствующие ячейки картриджа рассчитанное для данного эксперимента количество реактивов;
3. Закрыть картридж парафильмом.

ВНИМАНИЕ! Растворенные смеси ферментов и субстратов хранить при температуре не выше минус 16 °С. Нуклеотиды не замораживать (температура хранения +4 °С).

В. Подготовка планшета для секвенирования

Необходимые реактивы:

Праймеры для секвенирования.

1. Перемешать на вортексе праймеры для секвенирования;
2. В соответствии с шаблоном эксперимента, в анализируемые ячейки планшета для секвенирования раскатать по 25 мкл **праймеров для секвенирования**;
3. Закрыть планшет для секвенирования парафильмом.

ВНИМАНИЕ! Необходимо убедиться, что порядок ячеек в планшете для секвенирования соответствует заданному шаблону эксперимента.

Г. Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию

Необходимые реактивы:

Частицы сефарозы, покрытые стрептавидином (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare), связывающий буфер, H₂O стерильная, раствор для очистки, денатурирующий раствор, отмывочный буфер.

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо прогреть все реактивы и растворы при температуре от 22 до 25 °С.

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо приготовить однократный денатурирующий раствор и однократный отмывочный буфер из соответствующих 10-кратных стоковых растворов; для разведения 10-кратных стоковых растворов необходимо использовать стерильную H₂O.

Г1. Иммунизация ПЦР-продукта

1. Аккуратно встряхнуть бутылку с сефарозными частицами до получения однородной взвеси.
2. Приготовить в отдельной емкости (пробирке или флаконе) соответствующего объема следующую смесь для иммобилизации продукта ПЦР из расчета на один анализируемый образец:
 - а) частицы сефарозы – 2 мкл;
 - б) связывающий буфер – 40 мкл;
 - в) H₂O стерильная – 28 мкл.

Сделать расчет для необходимого числа исследуемых проб (N) можно согласно расчетной таблице (табл. 2). Необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше (N+1).

Таблица 2

Схема приготовления смеси для иммобилизации

Количество проб (N+1)	Объем реагентов на указанное количество проб, мкл		
	Частицы сефарозы	Связывающий буфер	H ₂ O стерильная
7	14	280	196
9	18	360	252
11	22	440	308
13	26	520	364
15	30	600	420
17	34	680	476
19	38	760	532
25	50	1000	700

ВНИМАНИЕ! Перед использованием приготовленную смесь тщательно перемешать на вортексе.

3. В планшет для ИФА в каждую анализируемую ячейку внести по 10 мкл ПЦР-продукта, затем добавить 70 мкл смеси для иммобилизации.

ВНИМАНИЕ! В процессе работы анализируемые образцы в ячейках *планшета* для ИФА должны быть сориентированы так же, как и в планшете для секвенирования.

4. Закрыть весь планшет парафильмом.

ВНИМАНИЕ! Все ячейки планшета должны быть закрыты для предотвращения попадания ПЦР-продукта в соседние ячейки в процессе инкубации на шейкере.

5. Поместить планшет на шейкер и инкубировать в течение 10 мин при 1350-1400 об/мин.

Г2. Пробоподготовка с использованием вакуумной станции

1. Подготовка рабочей станции:

а) заполнить пять ванночек следующим образом:

- примерно 40-50 мл **раствора для очистки**;
- примерно 40-50 мл **однократного денатурирующего раствора**;
- примерно 40-50 мл **однократного отмывочного буфера**;
- примерно 40-50 мл **Н₂О стерильная**;
- примерно 70 мл **Н₂О стерильная**.

б) включить вакуумный насос, после образования вакуума открыть вакуумный переключатель (**On**);

в) промыть зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночке с 70 мл **Н₂О стерильная** и убедиться, что вода потекла в контейнер для отходов;

г) поднять устройство вакуумной пробоподготовки, поддержать под углом больше 90° в течение 2-3 с и убедиться, что зонды фильтра сухие;

д) перекрыть вакуумный переключатель (**Off**) и поставить устройство вакуумной пробоподготовки в позицию **Parking**.

2. Пробоподготовка образцов:

а) снять *планшет для ИФА* с образцами с шейкера, осторожно опустить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в планшет;

б) поставить переключатель устройства вакуумной пробоподготовки в положение **On**, полностью отобрать ПЦР-продукт и смесь для иммобилизации из *планшета для ИФА*;

ВНИМАНИЕ! Частицы сефарозы быстро осаждаются, поэтому процедуру необходимо провести в течение одной минуты и убедиться, что вся жидкость отобрана из ячеек и частицы сефарозы собраны на фильтрах.

в) аккуратно поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **раствором для очистки** и промыть зонды в течение 5-10 с;

- г) поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **однократным денатурирующим раствором** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- д) поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **однократным отмывочным буфером** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- е) поднять устройство вакуумной пробоподготовки и поддержать фильтры вертикально в течение 2-3 с;
- ж) держа устройство вакуумной пробоподготовки над планшетом для секвенирования, выключить вакуумный переключатель (**Off**);
- з) опустить фильтры на дно ячеек и аккуратно встряхнуть устройство вакуумной пробоподготовки из стороны в сторону несколько раз, так, чтобы частицы сефарозы с зондов оказались в ячейках планшета для секвенирования;
- и) промыть фильтры в ванночке, содержащей 40-50 мл **H₂O стерильной**, в течение 5-10 с;
- к) поместить фильтры в ванночку, содержащую 70 мл **H₂O стерильной**, включить вакуумный переключатель (**On**) и промыть фильтры в течение 10 с;
- л) поднять устройство вакуумной пробоподготовки и поддержать фильтры вертикально в течение 5 с.
- м) установить инструмент в позицию **Parking**, выключить вакуумный насос, подождать несколько минут и перекрыть вакуумный переключатель (**Off**).

3. Отжиг праймеров на одноцепочечной ДНК:

- а) поставить планшет для секвенирования на предварительно разогретый до 80 °С фиксатор планшета и инкубировать в течение 2 мин;

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется закрыть планшет сверху парафильмом и алюминиевым прессом, чтобы избежать чрезмерного испарения жидкости из ячеек.

- б) снять планшет и дать ему остыть при комнатной температуре в течение 5 мин.

Д. Пиросеквенирование ПЦР-продукта

1. Запуск прибора PyroMark Q24:

- а) вставить картридж в прибор и закрепить положение картриджа фиксатором;
- б) поднять фиксатор для планшета, поместить планшет для секвенирования в прибор, опустить фиксатор, закрыть прибор;
- в) вставить в прибор флеш-карту с шаблоном эксперимента;
- г) на панели прибора выбрать в главном меню **Run** и нажать **OK**;
- д) открыть в окне прибора заданный шаблон эксперимента и нажать **Select**, подтвердить выбор шаблона эксперимента (**Yes**);

- е) после завершения реакции вынуть флеш-карту и приступить к обработке результатов анализа на компьютере.
2. Обработка результатов анализа:
- а) запустить программное обеспечение PyroMark Q24;
 - б) в меню **File** выбрать вкладку **Open** и открыть файл с результатами анализа;
 - в) проанализировать результаты секвенирования нажатием кнопки **Analyze All Wells**;
 - г) в меню **Reports** выбрать опцию **SNP Analysis Results**, посмотреть или сохранить результаты анализа нажатием кнопок **Preview** или **Save**, соответственно.

Прибор PyroMark Q96 MD

А. Программирование прибора PyroMark Q96 MD

1. Включить прибор.

ВНИМАНИЕ! Перед запуском необходимо прогреть прибор в течение 90 мин.

2. Запустить программное обеспечение **PyroMark MD**.

3. Приступить к настройке тестов:

- а) в главном меню выбрать **SNP**, затем вкладку **Simplex Entries**, нажатием правой кнопкой мыши выбрать пункт **New Entry**,
 - в строку **Entry ID** ввести название теста;
 - в строку **Sequence to Analyze** ввести анализируемую последовательность;
 - определить порядок ввода в реакционную смесь нуклеотидов нажатием кнопки **Generate Dispensation Order**,
- б) сохранить тест, нажав **Save**, и закрыть окно настройки тестов.

4. Подготовка анализа – создание шаблона эксперимента:

Секвенирование одного планшета:

- а) в главном меню выбрать **SNP Runs**, в открывшемся окне нажатием правой кнопкой мыши в папке **SNP Runs** выбрать пункт **New SNP Run**;
- б) в открывшемся окне задать название и параметры эксперимента;
- в) в строке **Instrument Parameters** выбрать **Instrument Parameters MD 0003CDT** или метод, указанный в инструкции к набору реагентов;
- г) в окне **Active Wells** с помощью мыши выбрать ячейки, в которых находятся исследуемые образцы, и нажать кнопку **Activate**;
- д) выбрать вкладку **Setup**, затем **Entry**, нажать кнопку **Simplex**, в строке **Entry** выбрать нужный тест и с помощью «карандаша» отметить ячейки с исследуемыми образцами;

- е) во вкладках **Sample ID** и **Notes** задать названия и примечания для исследуемых образцов;
- ж) выбрать вкладку **General**, нажать **View**, выбрать **Run**;
- з) в появившемся окне будет указано количество реактивов, необходимое для проведения анализа, переписать или распечатать эту информацию для проведения подготовки картриджа;
- и) нажать **Save** и закрыть окно.

Секвенирование нескольких планшетов («пакетный» запуск):

- а) повторить процедуру создания шаблона эксперимента для каждого планшета в отдельности (см. пункт 4а);
- б) в главном меню выбрать **Batch**, в открывшемся окне нажатием правой кнопкой мыши в опции **Batch** выбрать пункт **New Batch**;
- в) выбрать вкладку **Setup**, задать название и параметры эксперимента;
- г) в главном меню нажать **SNP Runs** и перенести с помощью мыши каждый созданный шаблон в окно **Run Name**;
- д) установить функции **Use Barcode** и **Analyze SNP**;
- е) нажать **Save**;
- ж) в меню **Batch** выбрать **Setup Information**;
- з) в появившемся окне будет указано количество реактивов, необходимое для проведения анализа; переписать или распечатать эту информацию для проведения подготовки картриджа.

Б. Подготовка картриджа

Необходимые реактивы:

Набор реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents (Qiagen), H₂O стерильная (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

ВНИМАНИЕ! Все действия следует осуществлять согласно «Руководству по эксплуатации реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents».

Программное обеспечение рассчитает необходимое для анализа количество реактивов: смеси **ферментов** («Е»), **субстратов** («S») и **нуклеотиды** («А», «Т», «С», «G»).

1. Растворить лиофилизированные смеси **ферментов** и **субстратов** в H₂O **стерильная** в соответствии с руководством к набору **PyroMark Gold Q96 Reagents**;
2. Внести в соответствующие ячейки картриджа рассчитанное для данного эксперимента количество реактивов;
3. Закрыть картридж парафильмом.

ВНИМАНИЕ! При работе с картриджем необходимо предварительно вставить в него наконечники, отведя в стороны фиксаторы.

ВНИМАНИЕ! Растворенные смеси ферментов и субстратов хранить при температуре не выше минус 16 °С. Нуклеотиды не замораживать (температура хранения +4 °С).

В. Подготовка планшета для секвенирования

Необходимые реактивы:

Праймеры для секвенирования.

1. Перемешать на вортексе праймеры для секвенирования;
2. В соответствии с шаблоном эксперимента, в анализируемые ячейки планшета для секвенирования раскатать по 12 мкл праймеров для секвенирования;
3. Закрыть планшет для секвенирования парафильмом.

ВНИМАНИЕ! Необходимо убедиться, что порядок ячеек в планшете для секвенирования соответствует заданному шаблону эксперимента.

Г. Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию

Необходимые реактивы:

Частицы сефарозы, покрытые стрептавидином (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare), связывающий буфер, H₂O стерильная, раствор для очистки, денатурирующий раствор, отмывочный буфер.

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо прогреть все реактивы и растворы при температуре от 22 до 25 °С.

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо приготовить однократный денатурирующий раствор и однократный отмывочный буфер из соответствующих 10-кратных стоковых растворов; для разведения 10-кратных стоковых растворов необходимо использовать стерильную H₂O.

Г1. Иммобилизация ПЦР-продукта

1. Аккуратно встряхнуть бутылку с сефарозными частицами до получения однородной взвеси.
2. Приготовить в отдельной емкости (пробирке или флаконе) соответствующего объема следующую смесь для иммобилизации продукта ПЦР из расчета на 1 анализируемый образец:
 - а) частицы сефарозы – 2 мкл;
 - б) связывающий буфер – 40 мкл;
 - в) H₂O стерильная – 28 мкл.

Сделать расчет для необходимого числа исследуемых проб (N) можно согласно **расчетной таблице** (табл. 3). Необходимо брать реагенты **с запасом** и рассчитывать на одну реакцию больше (N+1).

24

Схема приготовления смеси для иммобилизации

Количество проб (N+1)	Объем реагентов на указанное количество проб, мкл		
	Частицы сефарозы	Связывающий буфер	H ₂ O стерильная
7	14	280	196
9	18	360	252
11	22	440	308
13	26	520	364
15	30	600	420
17	34	680	476
19	38	760	532
25	50	1000	700
33	66	1320	924
41	82	1640	1148
49	98	1960	1372
57	114	2280	1596
65	130	2600	1820
73	146	2920	2044
81	162	3240	2268
89	178	3560	2492
97	194	3880	2716

ВНИМАНИЕ! Перед использованием приготовленную смесь тщательно перемешать на вортексе.

3. В *планшет* для ИФА в каждую анализируемую ячейку внести по 10 мкл ПЦР-продукта, затем добавить 70 мкл **смеси для иммобилизации**.

ВНИМАНИЕ! В процессе работы анализируемые образцы в ячейках *планшета* для ИФА должны быть сориентированы так же, как и в планшете для секвенирования.

4. Закрывать весь планшет парафильмом.

ВНИМАНИЕ! Все ячейки планшета должны быть закрыты для предотвращения попадания ПЦР-продукта в соседние ячейки в процессе инкубации на шейкере.

5. Поместить планшет на шейкер и инкубировать в течение 10 мин при 1350-1400 об/мин.

Г2. Пробоподготовка с использованием вакуумной станции

1. Подготовка рабочей станции:

а) заполнить пять ванночек следующим образом:

– примерно 40-50 мл **раствора для очистки**;

- примерно 40-50 мл **однократного денатурирующего раствора**;
- примерно 40-50 мл **однократного отмывочного буфера**;
- примерно 70 мл **H₂O стерильная**.

- б) включить вакуумный насос, после образования вакуума открыть вакуумный переключатель (**On**);
- в) промыть зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночке с 70 мл **H₂O стерильная** и убедиться, что вода потекла в контейнер для отходов;
- г) поднять устройство вакуумной пробоподготовки, поддержать под углом больше 90° в течение 2-3 с и убедиться, что зонды фильтра сухие;
- д) перекрыть вакуумный переключатель (**Off**) и поставить устройство вакуумной пробоподготовки в позицию **Parking**.

2. Пробоподготовка образцов:

- а) снять *планшет для ИФА* с образцами с шейкера, осторожно опустить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в планшет;
- б) поставить переключатель устройства вакуумной пробоподготовки в положение **On**, полностью отобрать ПЦР-продукт и смесь для иммобилизации из *планшета для ИФА*;

ВНИМАНИЕ! Частицы сефарозы быстро осаждаются, поэтому процедуру необходимо провести в течение одной минуты и убедиться, что вся жидкость отобрана из ячеек и частицы сефарозы собраны на фильтрах.

- в) аккуратно поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **раствором для очистки** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- г) поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **однократным денатурирующим раствором** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- д) поместить зонды устройства вакуумной пробоподготовки в ванночку с **однократным отмывочным буфером** и промыть зонды в течение 5-10 с;
- е) поднять устройство вакуумной пробоподготовки и поддержать фильтры вертикально в течение 2-3 с;
- ж) держа устройство вакуумной пробоподготовки над планшетом для секвенирования, выключить вакуумный переключатель (**Off**);
- з) опустить фильтры на дно ячеек и аккуратно встряхнуть устройство вакуумной пробоподготовки из стороны в сторону несколько раз, так, чтобы частицы сефарозы с зондов оказались в ячейках планшета для секвенирования;
- и) поместить фильтры в ванночку, содержащую 70 мл **H₂O стерильной**, включить вакуумный переключатель (**On**) и промыть фильтры в течение 10 с;

к) поднять устройство вакуумной пробоподготовки и поддержать фильтры вертикально в течение 5 с.

л) установить инструмент в позицию **Parking**, выключить вакуумный насос, подождать несколько минут и перекрыть вакуумный переключатель (**Off**).

3. Отжиг праймеров на одноцепочечной ДНК:

а) поставить планшет для секвенирования на предварительно разогретый до 80 °С фиксатор планшета и инкубировать в течение 2 мин;

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется закрыть планшет сверху парафильмом и алюминиевым прессом, чтобы избежать чрезмерного испарения жидкости из ячеек.

б) снять планшет и дать ему остыть при комнатной температуре в течение 5 мин.

Д. Пиросеквенирование ПЦР-продукта

1. Запуск прибора PyroMark Q96 MD:

а) открыть крышку прибора, поднять крышку фиксирующую картридж, вставить картридж в прибор и закрепить положение картриджа фиксатором;

б) в главном меню программы выбрать **Instrument**, затем **Manage**, появившемся окне **Manage Instruments** нажать **Open** (прибор поднимет крышку, которая фиксирует планшет для секвенирования);

в) убедиться в проходимости диспенсоров картриджа, для этого:

- поставить в прибор пустой планшет для секвенирования, предварительно закрытый парафильмом, в окне **Manage Instruments**, нажать **Close** и закрыть крышку прибора;

- в окне **Manage Instruments** нажать **Test**;

- в окне **Manage Instruments** нажать **Open**, открыть крышку, проанализировать капли на парафильме, капли должны быть расположены в следующем порядке: ячейка **D5** – E, **D8** – S, **E5** – A, **E6** – C, **E7** – G, **E8** – T.

Секвенирование одного планшета:

г) поставить в прибор планшет с образцами для секвенирования, в окне **Manage Instruments** нажать **Close** и закрыть крышку прибора;

д) в главном меню выбрать **SNP**, затем **SNP Runs**, в окне **SNP Runs** открыть шаблон эксперимента и нажать **Run**;

е) после завершения реакции нажать **Close** и приступить к обработке результатов анализа.

Секвенирование нескольких планшето́в:

г) вытащить емкость для планшетов, отвести фиксатор в сторону, вставить планшеты с исследуемыми образцами;

- д) в главном меню выбрать **SNP**, затем **Batch**, в окне **Batch Name** выбрать шаблон эксперимента и нажать **Play**.
- е) после завершения секвенирования нажать **Stop**.
- 2. Обработка результатов анализа:
 - а) запустить программное обеспечение **PyroMark MD**;
 - б) в главном меню выбрать **SNP**, затем **SNP Runs**, в окне **SNP Runs** открыть файл с результатами анализа;
 - в) проанализировать результаты секвенирования нажатием кнопки **All** в меню **Analyze**;
 - г) посмотреть результаты анализа для исследованных образцов, выбрав вкладку **Well Info**, или экспортировать данные с помощью опции **Report**.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об исследуемых генетических локусах, представленных в **Приложениях** к соответствующим **профилям** генетических исследований. При анализе результатов следует учитывать направление секвенирования, указанное в столбце **Анализ** (секвенирование прямой или обратной цепи). Анализ аллельного состояния полиморфизмов проводится автоматически программным обеспечением прибора. Результатом анализа является определение генотипа по каждому генетическому локусу, входящему в исследуемый профиль. Варианты определяемого генотипа: гомозигота по частому аллелю, гетерозигота, гомозигота по редкому аллелю (столбец **Генотип**).

ВНИМАНИЕ! В том случае, если в отрицательном контрольном образце определяется нуклеотидная последовательность, соответствующая заданному локусу, результаты анализа по клиническим пробам являются недостоверными.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разуконплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)².

Заведующий НПЛ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Директор Учреждения российской
академии медицинских наук
научно-исследовательский институт
медицины труда РАМН
д.м.н., профессор, академик РАМН



Н.Ф. Измеров

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата изготовления



Производитель

»

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 14

Роспотребнадзор лист 66



Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

Лисицына

А.О.Лисицына

«28» 2024 г.

и.п.

Приложение

к инструкции по применению набора реагентов для детекции генетических полиморфизмов методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа серии PyroMark

«АмплиСенс® Пироскрин»

✳

«ФОЛАТ-скрин»

Профиль генетического исследования

«Фолатный цикл»

Комплект реагентов «ФОЛАТ-скрин» – комплект реагентов для амплификации и пиросеквенирования – **включает:**

Реактив	Описание	Локус (полиморфизм)	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1 ФЦ-1	Прозрачная бесцветная жидкость	MTHFR (A222V, C>T)	0,275	1 пробирка
ПЦР-смесь-1 ФЦ-2	Прозрачная бесцветная жидкость	MTHFR (E429A, A>C)	0,275	1 пробирка
ПЦР-смесь-1 ФЦ-3	Прозрачная бесцветная жидкость	MTR (D919G, A>G)	0,275	1 пробирка
ПЦР-смесь-1 ФЦ-4	Прозрачная бесцветная жидкость	MTRR (I22M, A>G)	0,275	1 пробирка
ПЦР-смесь-1 ФЦ-5	Прозрачная бесцветная жидкость	SLC19A1 (H27R, A>G)	0,275	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	–	0,03	5 пробирок
2,5x ПЦР-буфер blue	Прозрачная жидкость синего цвета	–	0,6	5 пробирок
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	–	4,0	2 флакона
Праймер для секвенирования ФЦ-1-S	Прозрачная бесцветная жидкость	MTHFR (A222V, C>T)	0,33	5 пробирок
Праймер для секвенирования ФЦ-2-S	Прозрачная бесцветная жидкость	MTHFR (E429A, A>C)	0,33	5 пробирок
Праймер для секвенирования ФЦ-3-S	Прозрачная бесцветная жидкость	MTR (D919G, A>G)	0,33	5 пробирок
Праймер для секвенирования ФЦ-4-S	Прозрачная бесцветная жидкость	MTRR (I22M, A>G)	0,33	5 пробирок
Праймер для секвенирования ФЦ-5-S	Прозрачная бесцветная жидкость	SLC19A1 (H27R, A>G)	0,33	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций пиросеквенирования для каждого исследуемого генетического локуса.

К комплекту реагентов прилагается следующий реагент:

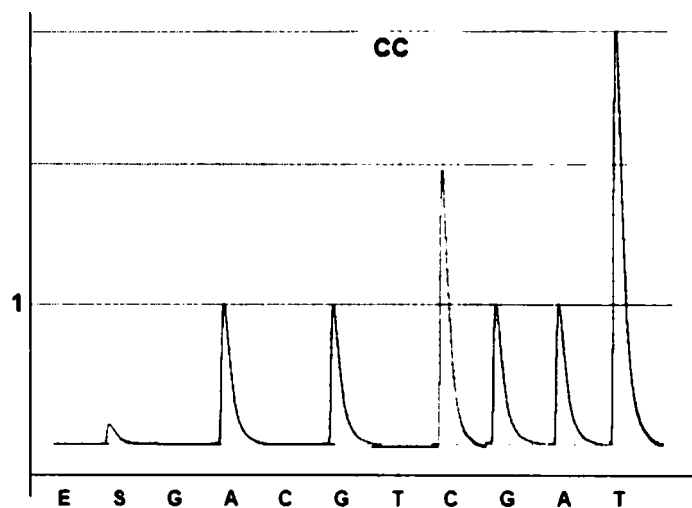
Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Анализируемые полиморфизмы

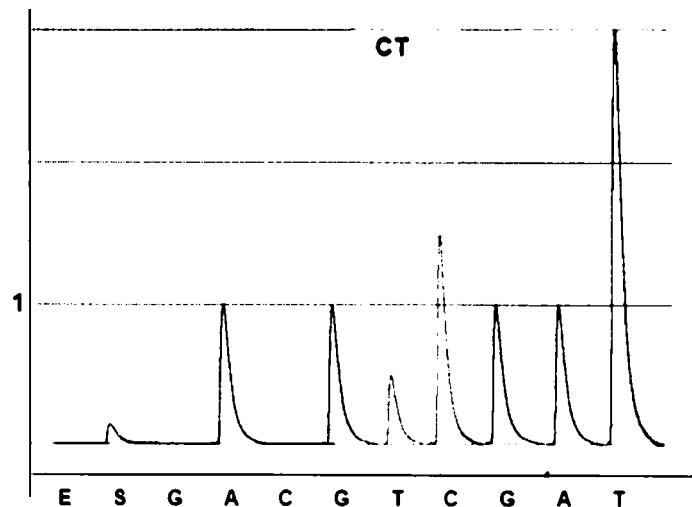
Локус	Продукт	Полиморфизм	rs	Последовательность для анализа	Анализ	Варианты генотипа
MTHFR	Метилентетрагидрофолатредуктаза	A222V, C>T	rs1801133	AGC/TCGATTTC	прямой	CC CT TT
MTHFR	Метилентетрагидрофолатредуктаза	E429A, A>C	rs1801131	AGA/CAAGTGTCTT	прямой	AA AC CC
MTR	Метионинсинтаза	D919G, A>G	rs1805087	A/GCCATTATGA	прямой	AA AG GG
MTRR	Метионинсинтазаредуктаза	I22M, A>G	rs1801394	TA/GTGTGAGCA	прямой	AA AG GG
SLC19A1	Транспортер фолатов	H27R, A>G	rs1051266	GT/CGCCGCCA	обратный	AA AG GG

Схемы ожидаемых результатов

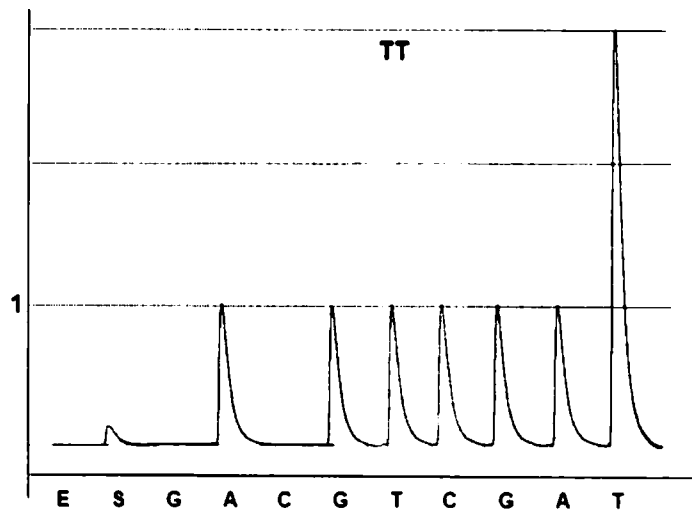
Локус: MTHFR, полиморфизм A222V, C>T



Генотип: CC

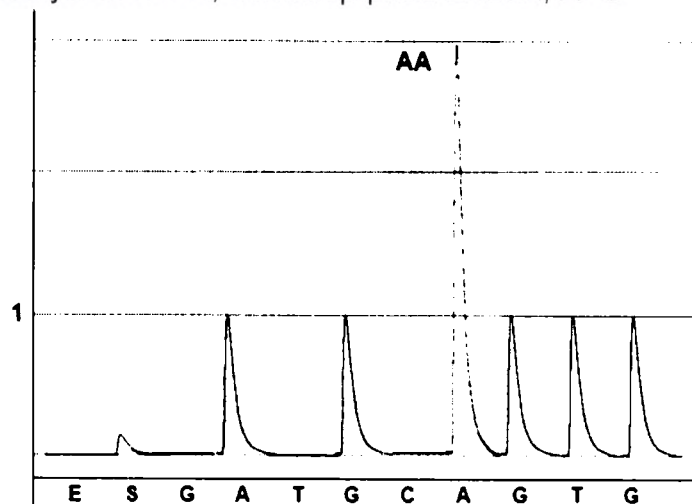


Генотип: CT

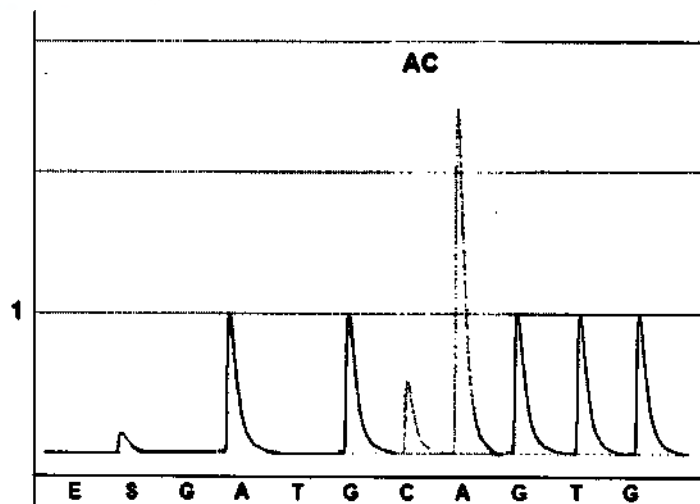


Генотип: TT

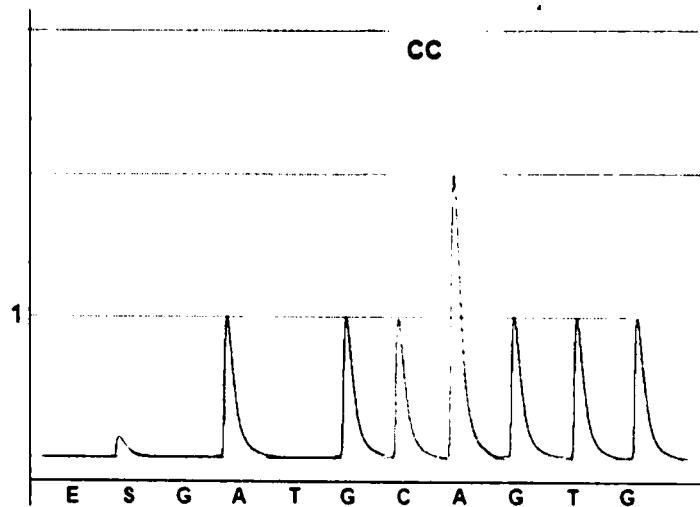
Локус: MTHFR, полиморфизм E429A, A>C



Генотип: AA

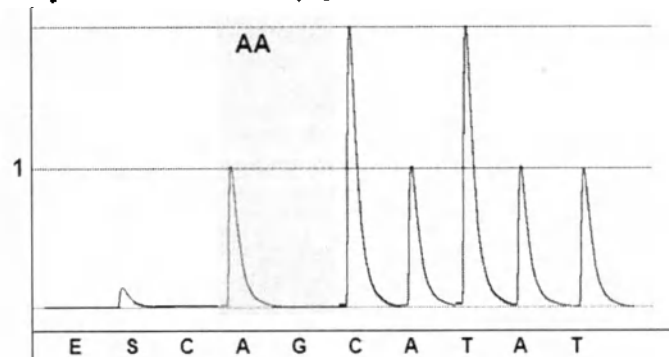


Генотип: AC

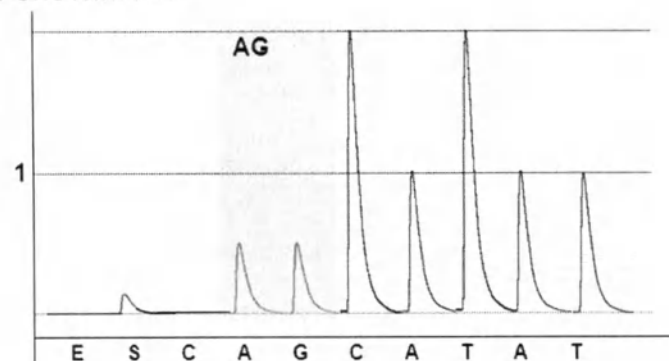


Генотип: CC

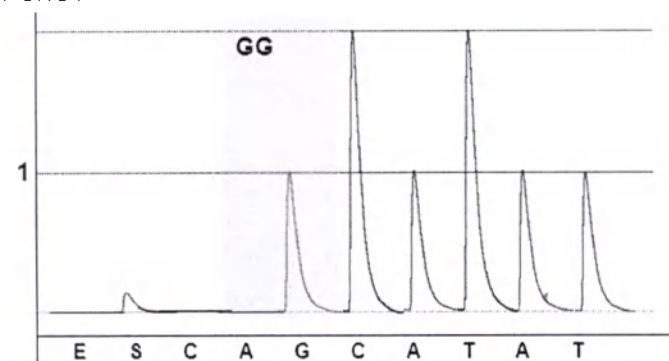
Локус: MTR, полиморфизм D919G, A>G



Генотип: AA

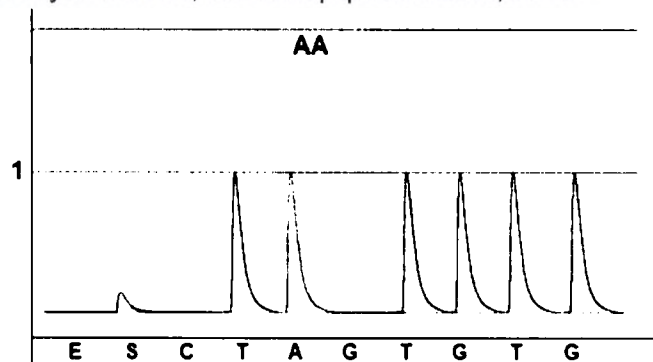


Генотип: AG

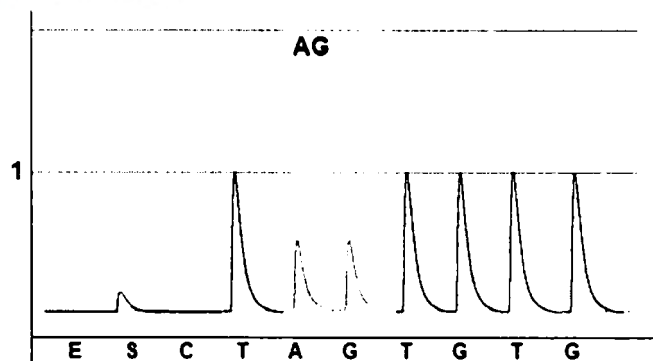


Генотип: GG

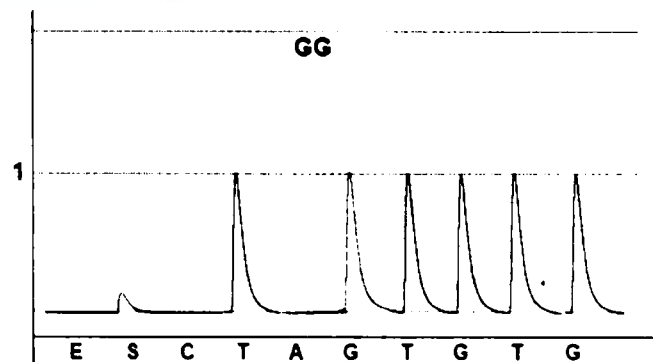
Локус: MTRR, полиморфизм I22M, A>G



Генотип: AA

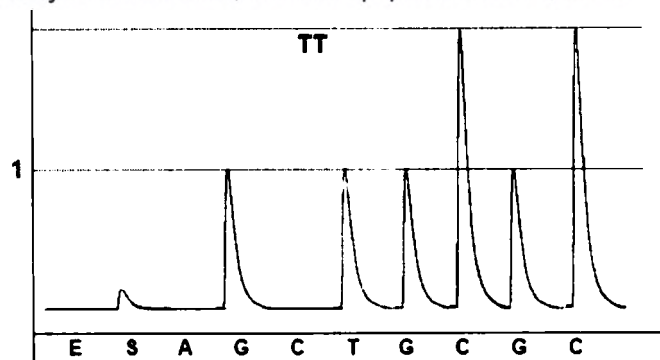


Генотип: AG

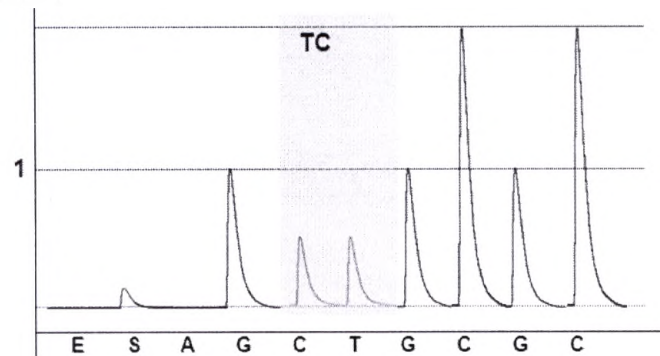


Генотип: GG

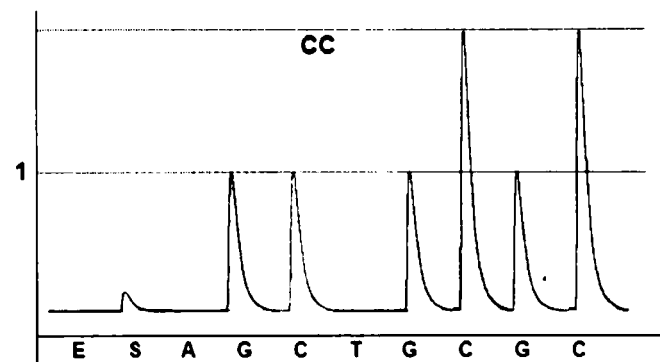
Локус: SLC19A1, полиморфизм H27A, A>G



Генотип: AA



Генотип: AG



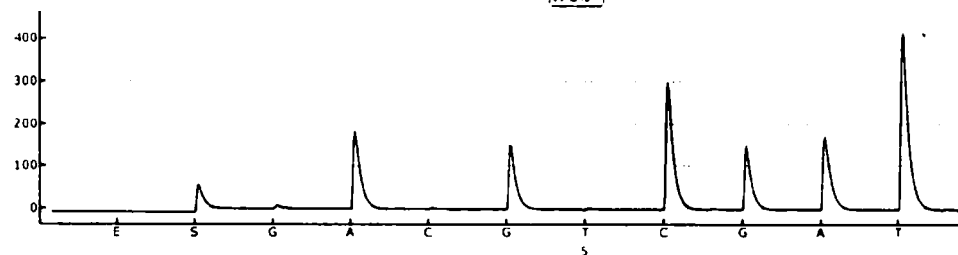
Генотип: GG

Примеры результатов

Локус: MTHFR, полиморфизм A222V, C>T

A1 AGG TCGATTTC

C: 98%
T: 2%

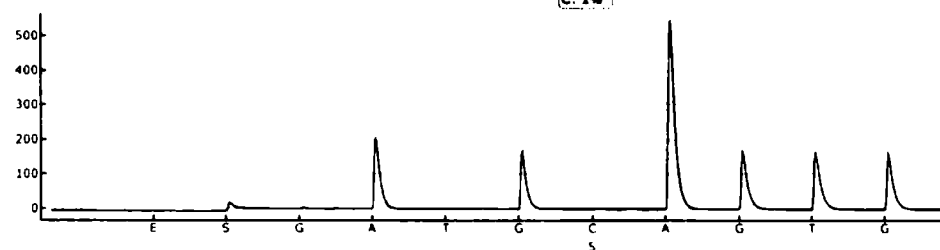


Генотип: CC

Локус: MTHFR, полиморфизм E429A, A>C

B1 AGA CAAGTGTATT

A: 99%
C: 1%

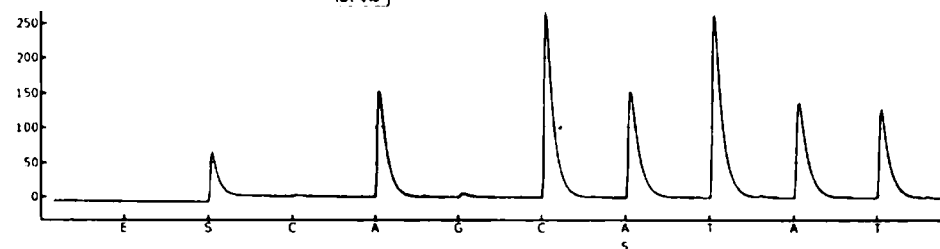


Генотип: AA

Локус: MTR, полиморфизм D919G, A>G

C1 A/GGCATTATGA

A: 96%
G: 4%

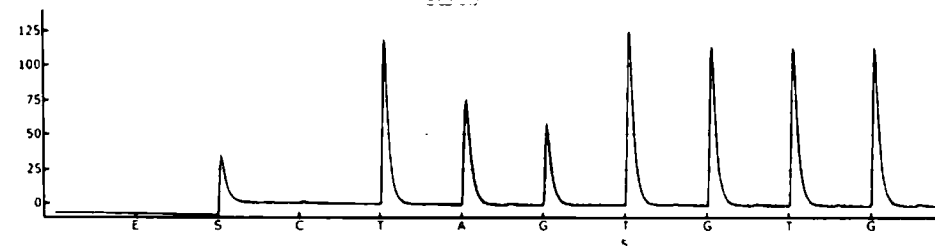


Генотип: AA

Локус: MTRR, полиморфизм I22M, A>G

A1 TA/GTGTCAACA

A: 53%
G: 47%

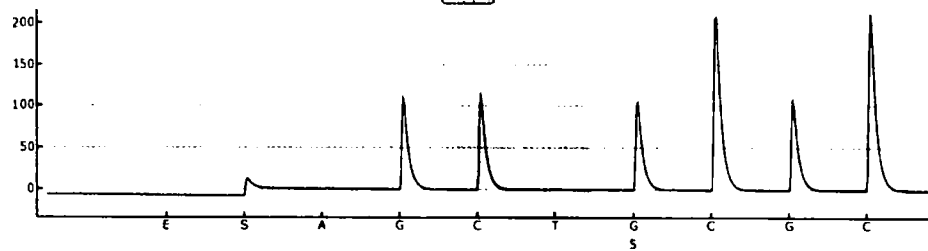


Генотип: AG

Локус: SLC19A1, полиморфизм H27A, A>G

B1 GT/CGCCGCCA

C: 99%
T: 1%



Генотип: GG

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 6

(исечно)

лист 06

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

« 07 »



А.О.Лисицына



ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® MTR/MTRR-SNP-FL

Форма 1: REF S-4481-1

LOT 21.02.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал для флуорофора	Calibrate/Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	20%
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	20%
ROX/Orange	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	20%
Cy5/Red	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	20%

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5°C/sec**.

«ДТ-96»/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница/ порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct(Cp)	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/R6G, ROX, Cy5	90%	10 StD	5% F(Cp)	30% F(Cp)	Не использовать	Включить

Установка пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа

Канал для флуорофора	Threshold/Порог
FAM	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК ФЦ 1
JOE	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК ФЦ 2
ROX	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК ФЦ 1
Cy5	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК ФЦ 2

***Внимание!** Если модуль разницы значений пороговых циклов (Ct) между двумя каналами для флуорофоров (FAM, JOE, ROX и Cy5) для К+ ДНК ФЦ превышает 0,5, пороговые линии корректируются до достижения разницы значений Ct между каналами менее 0,5 по модулю.

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

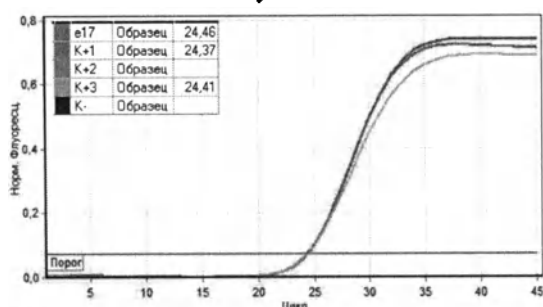
Образец	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	ROX	Cy5
К+ ДНК ФЦ 1	≤ 29,0	Отсутствует либо Δ Ct (JOE/FAM) > 3	≤ 29,0	Отсутствует либо Δ Ct (Cy5/ROX) > 3
К+ ДНК ФЦ 2	Отсутствует, либо Δ Ct (FAM/JOE) > 3	≤ 29,0	Отсутствует, либо Δ Ct (ROX/Cy5) > 3	≤ 29,0
К+ ДНК ФЦ 3	≤ 29,0	≤ 29,0	≤ 29,0	≤ 29,0
К-	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5
ОК	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5
MTR, rs1805087 гомозигота AA	≤ 34,5	Отсутствует, либо Δ Ct (JOE/FAM) > 3	Отсутствует	Отсутствует
MTR, rs1805087 гетерозигота AG	≤ 34,5	≤ 34,5	Отсутствует	Отсутствует
	Δ Ct (FAM/JOE) < 1		Отсутствует	Отсутствует
MTR, rs1805087 гомозигота GG	Отсутствует, либо Δ Ct (FAM/JOE) > 3	≤ 34,5	Отсутствует	Отсутствует
MTRR, rs1801394 гомозигота AA	Отсутствует	Отсутствует	≤ 34,5	Отсутствует, либо Δ Ct (Cy5/ROX) > 3
	Отсутствует	Отсутствует	≤ 34,5	≤ 34,5
MTRR, rs1801394 гетерозигота AG	Отсутствует	Отсутствует	Δ Ct (ROX/Cy5) < 1	
MTRR, rs1801394 гомозигота GG	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует, либо Δ Ct (ROX/Cy5) > 3	≤ 34,5

ПРИЛОЖЕНИЕ К ВКЛАДЫШУ по применению набора реагентов АмплиСенс® MTR/MTRR-SNP-FL
Примеры интерпретации результатов анализа исследуемых образцов, полученных на приборе Rotor-Gene:

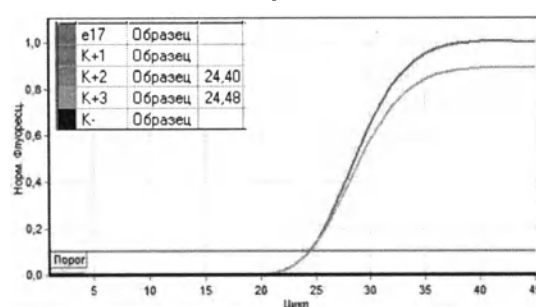
а) Пример ожидаемых результатов для полиморфизма rs1805087

Гомозигота AA

Анализ по каналу FAM/Green

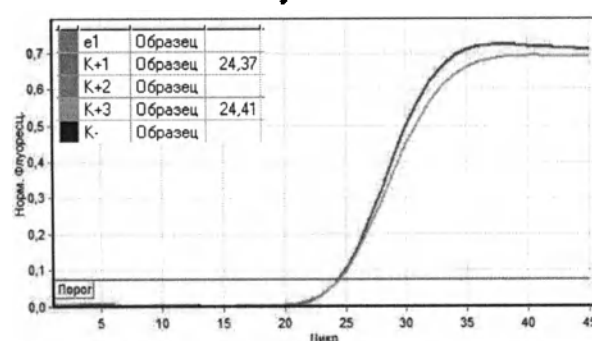


Анализ по каналу JOE/Yellow

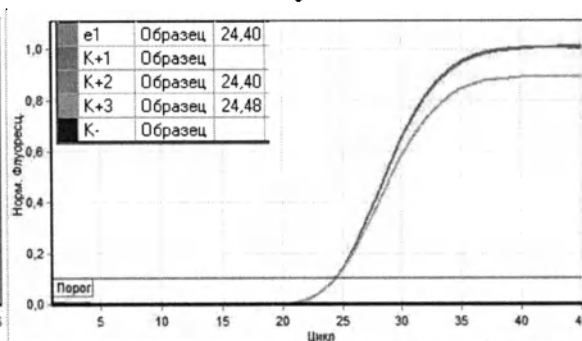


Гомозигота GG

Анализ по каналу FAM/Green

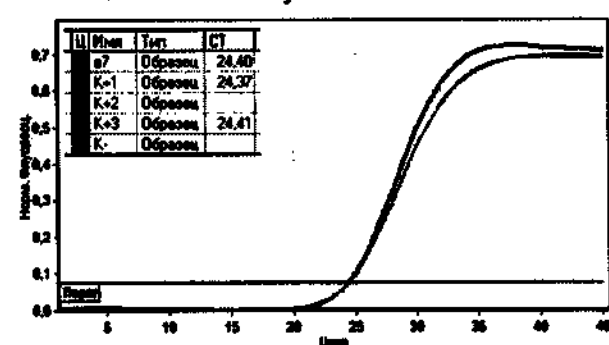


Анализ по каналу JOE/Yellow

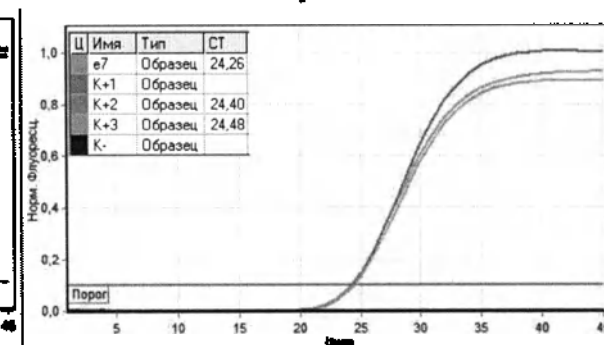


Гетерозигота AG

Анализ по каналу FAM/Green



Анализ по каналу JOE/Yellow

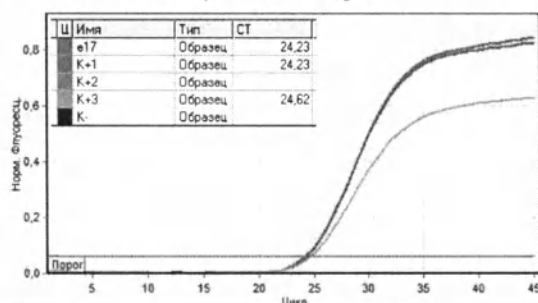


Образец	Значения Ct			Граничные значения для флуорофора		Результаты
	FAM	JOE	ΔCt	FAM	JOE	
К+ ДНК ФЦ 1	24,37	-	-	$\leq 29,0$	Отсутствует либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3$	Соответствует
К+ ДНК ФЦ 2	-	24,40	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3$	$\leq 29,0$	Соответствует
К+ ДНК ФЦ 3	24,41	24,48	-0,07	$\leq 29,0$	$\leq 29,0$	Соответствует
К-	-	-	-	Отсутствует или $> 34,5$	Отсутствует или $> 34,5$	Соответствует
Исследуемый образец	24,46	-	-	$\leq 34,5$	Отсутствует, либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3$	Гомозигота AA
	-	24,40	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3$	$\leq 34,5$	Гомозигота GG
	24,40	24,26	-0,14	$\leq 34,5$	$\leq 34,5$	Гетерозигота AG
				$\Delta Ct (FAM/JOE) < 1$		

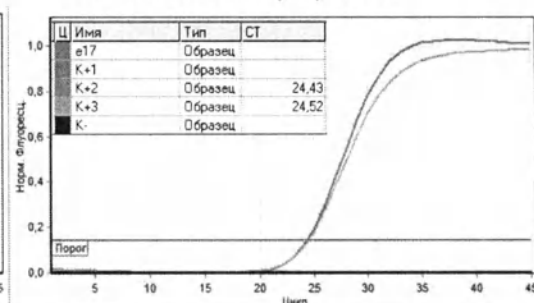
б) Пример ожидаемых результатов для полиморфизма rs1801394

Гомозигота AA

Анализ по каналу ROX/Orange

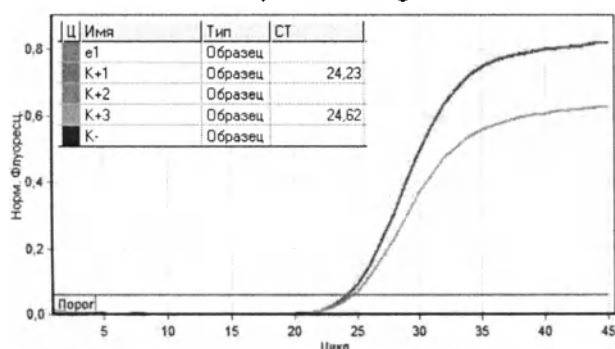


Анализ по каналу Cy5/Red

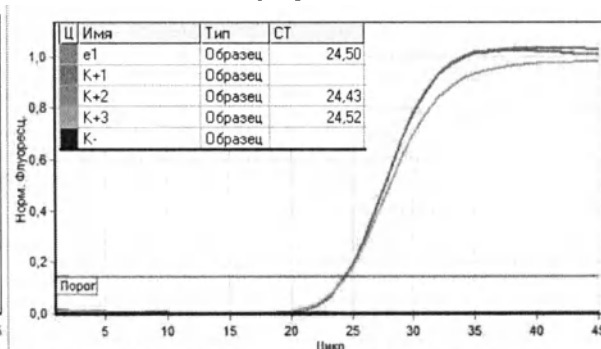


Гомозигота GG

Анализ по каналу ROX/Orange

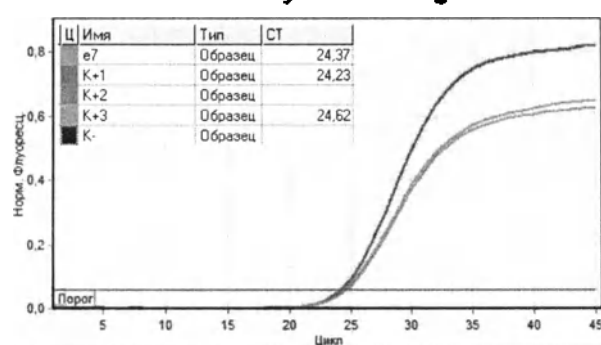


Анализ по каналу Cy5/Red

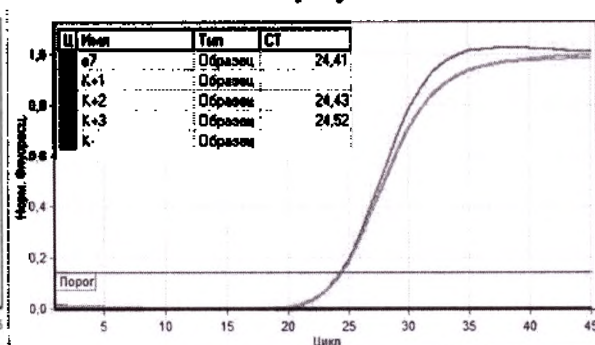


Гетерозигота AG

Анализ по каналу ROX/Orange



Анализ по каналу Cy5/Red



Образец	Значения Ct			Граничные значения для флуорофора		Результаты
	ROX	Cy5	ΔCt	ROX	Cy5	
К+ ДНК ФЦ 1	24,23	-	-	$\leq 29,0$	Отсутствует либо $\Delta Ct (Cy5/ROX) > 3$	Соответствует
К+ ДНК ФЦ 2	-	24,43	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (ROX/Cy5) > 3$	$\leq 29,0$	Соответствует
К+ ДНК ФЦ 3	24,62	24,52	-0,10	$\leq 29,0$	$\leq 29,0$	Соответствует
К-	-	-	-	Отсутствует или $> 34,5$	Отсутствует или $> 34,5$	Соответствует
Исследуемый образец	24,23	-	-	$\leq 34,5$	Отсутствует, либо $\Delta Ct (Cy5/ROX) > 3$	Гомозигота AA
	-	24,50	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (ROX/Cy5) > 3$	$\leq 34,5$	Гомозигота GG
	24,37	24,41	0,04	$\leq 34,5$	$\leq 34,5$	Гетерозигота AG
				$\Delta Ct (ROX/Cy5) < 1$		

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® MTR/MTRR-SNP-FL

Форма 1: **REF** S-4481-1

LOT A21.02.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал для флуорофора	Calibrate/Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	20%
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	20%
ROX/Orange	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	20%
Cy5/Red	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	20%

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5°C/sec.**

«ДТ-96»/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница/ порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct(Cp)	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/R6G, ROX, Cy5	90%	10 StD	5% F(Cp)	30% F(Cp)	Не использовать	Включить

Установка пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа

Канал для флуорофора	Threshold/Порог
FAM	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК ФЦ 1
JOE	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК ФЦ 2
ROX	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК ФЦ 1
Cy5	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК ФЦ 2

***Внимание!** Если модуль разницы значений пороговых циклов (Ct) между двумя каналами для флуорофоров (FAM, JOE, ROX и Cy5) для К+ ДНК ФЦ 3 превышает 0,5, пороговые линии корректируются до достижения разницы значений Ct между каналами менее 0,5 по модулю.

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	ROX	Cy5
К+ ДНК ФЦ 1	≤ 29,0	Отсутствует либо Δ Ct (JOE/FAM) > 3	≤ 29,0	Отсутствует либо Δ Ct (Cy5/ROX) > 3
К+ ДНК ФЦ 2	Отсутствует, либо Δ Ct (FAM/JOE) > 3	≤ 29,0	Отсутствует, либо Δ Ct (ROX/Cy5) > 3	≤ 29,0
К+ ДНК ФЦ 3	≤ 29,0	≤ 29,0	≤ 29,0	≤ 29,0
К-	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5
ОК	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5	Отсутствует или > 34,5
MTR, rs1805087 гомозигота AA	≤ 34,5	Отсутствует, либо Δ Ct (JOE/FAM) > 3	Отсутствует	Отсутствует
MTR, rs1805087 гетерозигота AG	≤ 34,5	≤ 34,5	Отсутствует	Отсутствует
	Δ Ct (FAM/JOE) < 1		Отсутствует	Отсутствует
MTR, rs1805087 гомозигота GG	Отсутствует, либо Δ Ct (FAM/JOE) > 3	≤ 34,5	Отсутствует	Отсутствует
MTRR, rs1801394 гомозигота AA	Отсутствует	Отсутствует	≤ 34,5	Отсутствует, либо Δ Ct (Cy5/ROX) > 3
MTRR, rs1801394 гетерозигота AG	Отсутствует	Отсутствует	≤ 34,5	≤ 34,5
	Отсутствует	Отсутствует	Δ Ct (ROX/Cy5) < 1	
MTRR, rs1801394 гомозигота GG	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует, либо Δ Ct (ROX/Cy5) > 3	≤ 34,5

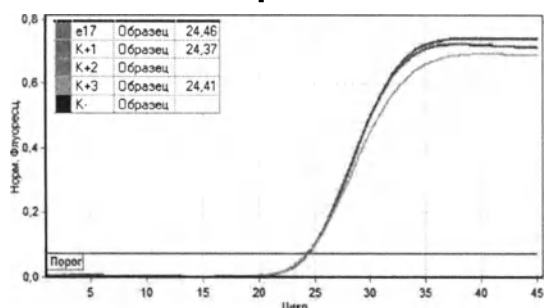
ПРИЛОЖЕНИЕ К ВКЛАДЫШУ по применению набора реагентов АмплиСенс® MTR/MTRR-SNP-FL

Примеры интерпретации результатов анализа исследуемых образцов, полученных на приборе Rotor-Gene:

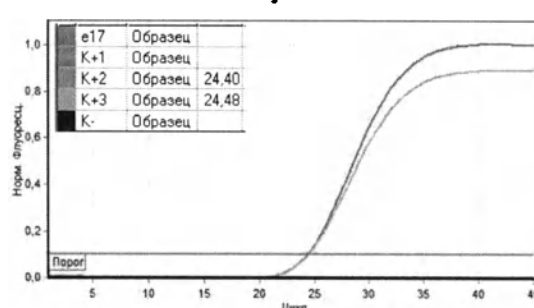
а) Пример ожидаемых результатов для полиморфизма rs1805087

Гомозигота AA

Анализ по каналу FAM/Green

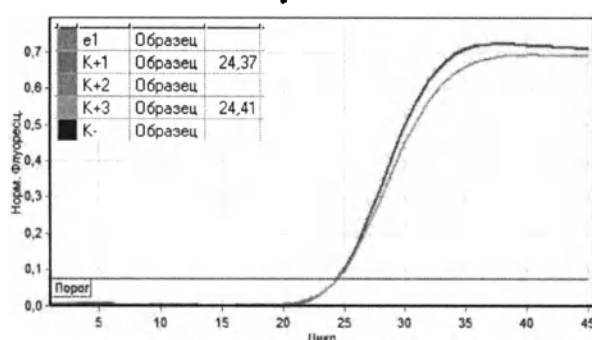


Анализ по каналу JOE/Yellow

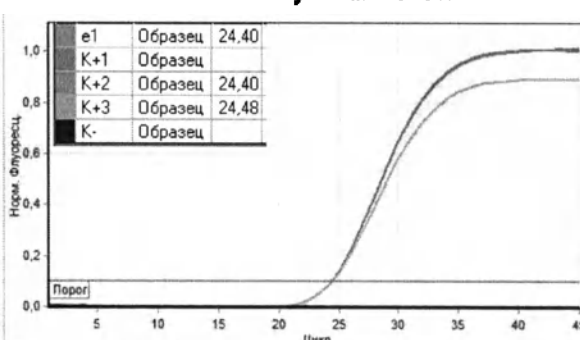


Гомозигота GG

Анализ по каналу FAM/Green

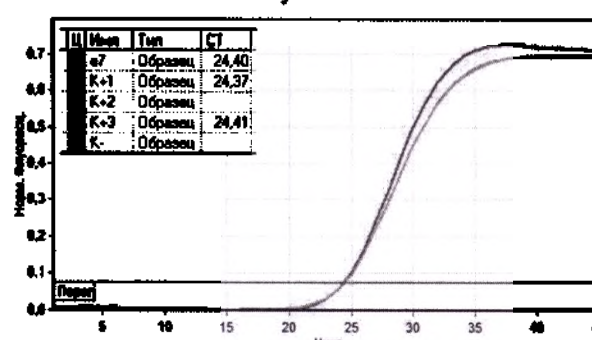


Анализ по каналу JOE/Yellow

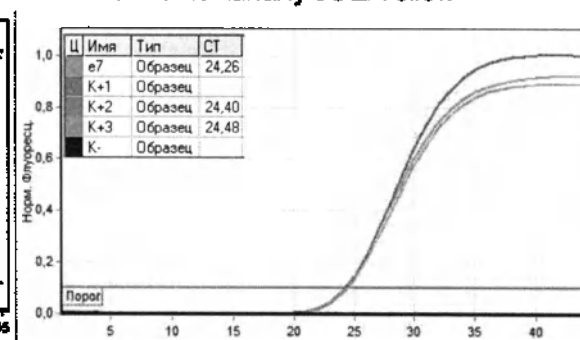


Гетерозигота AG

Анализ по каналу FAM/Green



Анализ по каналу JOE/Yellow

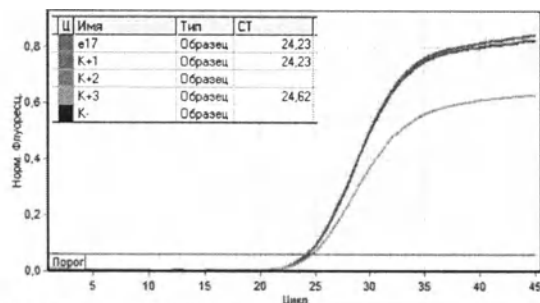


Образец	Значения Ct			Граничные значения для флуорофора		Результаты
	FAM	JOE	ΔCt	FAM	JOE	
К+ ДНК ФЦ 1	24,37	-	-	$\leq 29,0$	Отсутствует либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3$	Соответствует
К+ ДНК ФЦ 2	-	24,40	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3$	$\leq 29,0$	Соответствует
К+ ДНК ФЦ 3	24,41	24,48	-0,07	$\leq 29,0$	$\leq 29,0$	Соответствует
К-	-	-	-	Отсутствует или $> 34,5$	Отсутствует или $> 34,5$	Соответствует
Исследуемый образец	24,46	-	-	$\leq 34,5$	Отсутствует, либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3$	Гомозигота AA
	-	24,40	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3$	$\leq 34,5$	Гомозигота GG
	24,40	24,26	-0,14	$\leq 34,5$	$\leq 34,5$	Гетерозигота AG
				$\Delta Ct (FAM/JOE) < 1$		

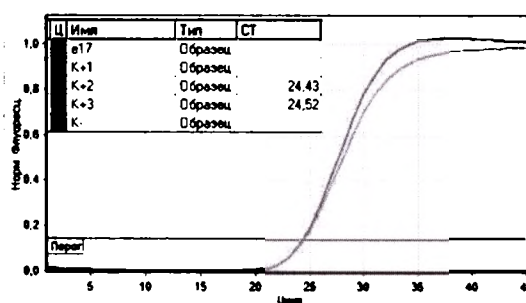
б) Пример ожидаемых результатов для полиморфизма rs1801394

Гомозигота AA

Анализ по каналу ROX/Orange

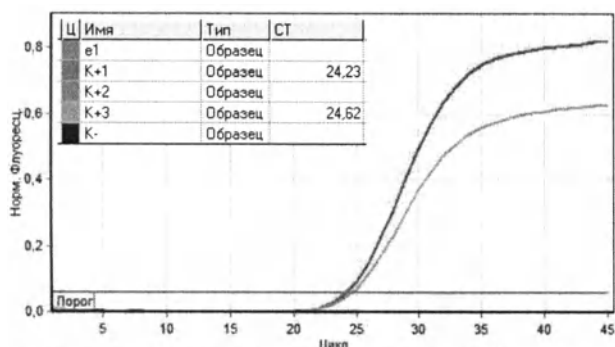


Анализ по каналу Cy5/Red

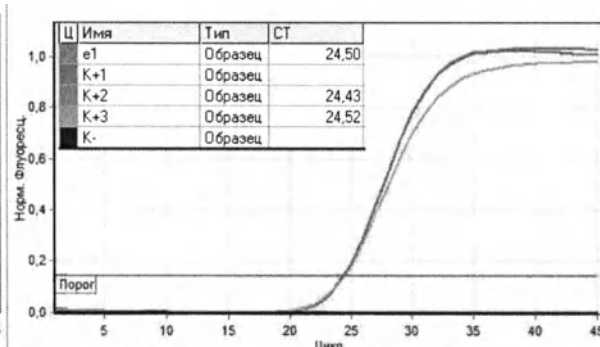


Гомозигота GG

Анализ по каналу ROX/Orange

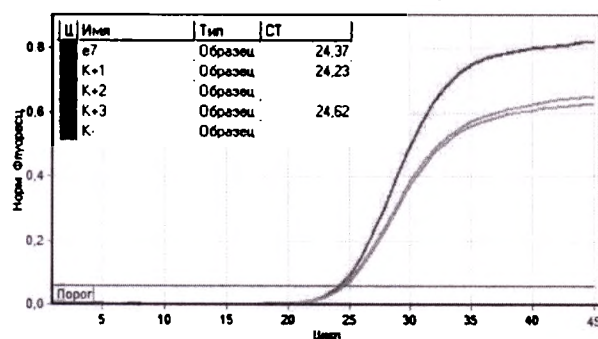


Анализ по каналу Cy5/Red

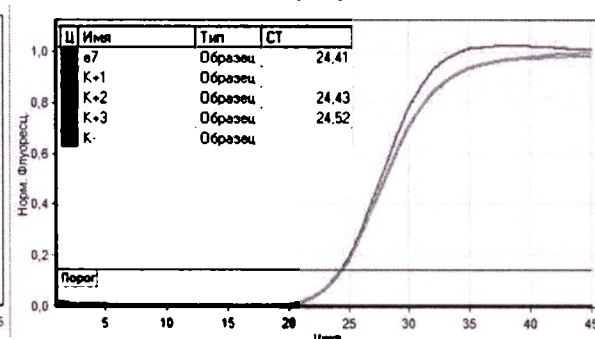


Гетерозигота AG

Анализ по каналу ROX/Orange



Анализ по каналу Cy5/Red



Образец	Значения Ct			Граничные значения для флуорофора		Результаты
	ROX	Cy5	ΔCt	ROX	Cy5	
К+ ДНК ФЦ 1	24,23	-	-	$\leq 29,0$	Отсутствует либо $\Delta Ct (Cy5/ROX) > 3$	Соответствует
К+ ДНК ФЦ 2	-	24,43	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (ROX/Cy5) > 3$	$\leq 29,0$	Соответствует
К+ ДНК ФЦ 3	24,62	24,52	-0,10	$\leq 29,0$	$\leq 29,0$	Соответствует
К-	-	-	-	Отсутствует или $> 34,5$	Отсутствует или $> 34,5$	Соответствует
Исследуемый образец	24,23	-	-	$\leq 34,5$	Отсутствует, либо $\Delta Ct (Cy5/ROX) > 3$	Гомозигота AA
	-	24,50	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (ROX/Cy5) > 3$	$\leq 34,5$	Гомозигота GG
	24,37	24,41	0,04	$\leq 34,5$	$\leq 34,5$	Гетерозигота AG
				$\Delta Ct (ROX/Cy5) < 1$		

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4
сертификат лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



05 20 24 г.
М.П.

А.О.Лисицына

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов для качественного определения генотипов по полиморфизмам rs1805087 в гене *MTR* и rs1801394 в гене *MTRR* методом ПЦР в режиме реального времени
АмплиСенс® MTR/MTRR-SNP-FL

Форма 1	LOT 21.02.24	 2024-02-21
		 2025-05-21

ТУ 21.20.23-448-01897593-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5	соответствует
Положительный результат для образца К+ ДНК ФЦ 1 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM и ROX	соответствует
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров JOE и FAM больше граничного значения	
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров Cy5 и ROX больше граничного значения	
Положительный результат для образца К+ ДНК ФЦ 2 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров JOE и Cy5	соответствует
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM и JOE больше граничного значения	
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров ROX и Cy5 больше граничного значения	
Положительный результат для образца К+ ДНК ФЦ 3 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5	соответствует
Определены генотипы 4-х тестируемых образцов ДНК человека по полиморфизмам rs1805087 и rs1801394	Значения <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5 соответствуют одному из вариантов, приведенных во вкладыше к набору реагентов	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
Часть 1 из 2			
К+ ДНК ФЦ 1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК ФЦ 2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК ФЦ 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Часть 2 из 2			
ПЦР-смесь-FL MTR/MTRR	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8°C не более 5 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25°C не более 3 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей по температуре хранения:

- часть 1 (К+ ДНК ФЦ 1, К+ ДНК ФЦ 2, К+ ДНК ФЦ 3, К-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL MTR/MTRR, ПЦР-буфер-С, полимераз (TaqF)) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL MTR/MTRR хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи
Руководитель ГKK

24.02.24



(подпись)

(Кодва О.И.)
(Ф.И.О.)

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов для качественного определения генотипов по полиморфизмам rs1805087 в гене *MTR* и rs1801394 в гене *MTRR* методом ПЦР в режиме реального времени
АмплиСенс® MTR/MTRR-SNP-FL

Форма 1	LOT A21.02.24	 2024-02-21
		 2025-05-21

ТУ 21.20.23-448-01897593-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5	соответствует
Положительный результат для образца К+ ДНК ФЦ 1 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM и ROX	соответствует
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров JOE и FAM больше граничного значения	
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров Cy5 и ROX больше граничного значения	
Положительный результат для образца К+ ДНК ФЦ 2 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров JOE и Cy5	соответствует
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM и JOE больше граничного значения	
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров ROX и Cy5 больше граничного значения	
Положительный результат для образца К+ ДНК ФЦ 3 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5	соответствует
Определены генотипы 4-х тестируемых образцов ДНК человека по полиморфизмам rs1805087 и rs1801394	Значения <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5 соответствуют одному из вариантов, приведенных во вкладыше к набору реагентов	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
Часть 1 из 2			
К+ ДНК ФЦ 1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК ФЦ 2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК ФЦ 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Часть 2 из 2			
ПЦР-смесь-FL MTR/MTRR	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8°C не более 5 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25°C не более 3 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей по температуре хранения:

- часть 1 (К+ ДНК ФЦ 1, К+ ДНК ФЦ 2, К+ ДНК ФЦ 3, К–, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL MTR/MTRR, ПЦР-буфер-С, полимераз (TaqF)) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL MTR/MTRR хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи
Руководитель ГKK

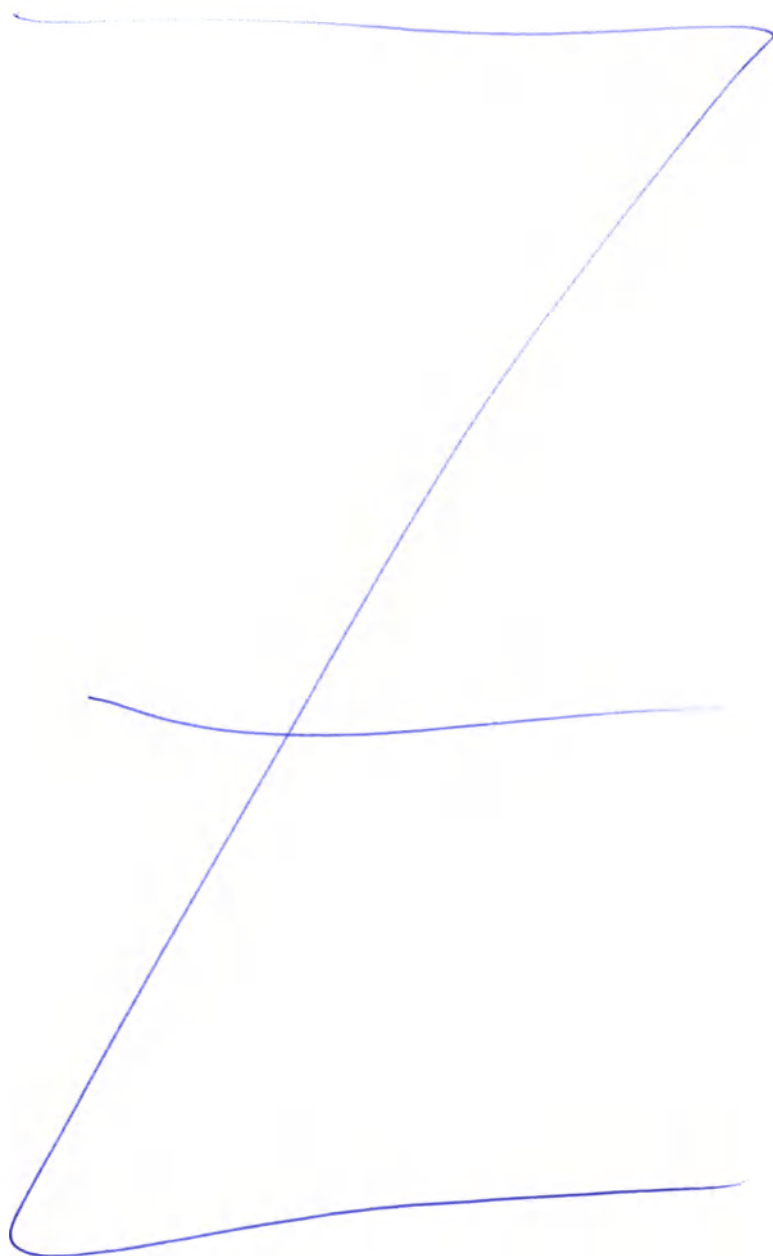
24.02.24



(подпись)

(Кодва О.И.)
(Ф.И.О.)

8°C;
40



КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3

лист 9

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

А.О.Лисицына



Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® MTR/MTRR-SNP-FL

Форма 1: **REF** S-4481-1



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции: «РИБО-преп».

Контроли: Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контроля и элюции	
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:	
Исследуемый образец	осадок, полученный после предобработки гемолитиком 100 мкл цельной венозной крови (порядок подготовки исследуемого материала см. в инструкции)
ОКО	100 мкл в пробирку для ОК
Элюция	
все образцы	50 мкл в каждую пробирку

- ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F**
- Общий объем реакционной смеси:** 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).
- Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов 3 положительных (K1+, K2+, K3+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).
- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
 - Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL MTR/MTRR.
 - В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL MTR/MTRR	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	$5 \cdot (N+K+1)$	
Полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь хранить не более 2 ч.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов и разведенных до концентрации 10-30 нг в реакцию	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК
K-	в пробирку для K-
K+ ДНК ФЦ 1	в пробирку для K1+
K+ ДНК ФЦ 2	в пробирку для K2+
K+ ДНК ФЦ 3	в пробирку для K3+

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе,
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить выполнение программы амплификации.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. Если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Ген	rs	Канал для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
MTR	rs1805087	аллель А	аллель G	–	–
MTRR	rs1801394	–	–	аллель А	аллель G

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (Ct), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2
(969) лист 9

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына

« 20 » 05 2024 г.
М.П.