

ГенТест-М NAT2

Набор реагентов для выявления полиморфизмов *C282T*, *T341C*, *C481T*, *G590A*, *A803G*, *G857A* в гене человека *NAT2* методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («ГенТест-М NAT2»)

Кат. № R2006

Инструкция по применению

Сокращения и обозначения

<i>C_q (C_t)</i>	Пороговый цикл
FAM	Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
Номенклатура HGVS	Nomenclature – Human Genome Variation Society
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
Олиго-смесь М	Обобщенное название компонентов набора: «Олиго-смесь М NAT2 C282Т», «Олиго-смесь М NAT2 T341С», «Олиго-смесь М NAT2 C481Т», «Олиго-смесь М NAT2 G590А», «Олиго-смесь М NAT2 A803G», «Олиго-смесь М NAT2 G857А»
ОКВ	Отрицательный контроль выделения
ПКО	Положительный контрольный образец
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией накопления продукта амплификации ДНК в режиме реального времени
ТУ	Технические условия

Оглавление

Сокращения и обозначения.....	2
1. Название, варианты исполнения	4
2. Сведения, необходимые для эксплуатации	4
3. Назначение, область применения.....	4
4. Состав, форма выпуска	5
5. Количество анализируемых образцов, кратность применения.....	6
6. Принцип действия	6
7. Научная обоснованность анализа	7
8. Аналитические характеристики.....	7
9. Ограничения метода.....	7
10. Меры предосторожности.....	9
11. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки	10
12. Биологический материал	11
13. Протокол анализа образца	12
14. Анализ данных	15
15. Условия транспортирования, хранения и использования	18
16. Срок годности	18
17. Критерии непригодности набора реагентов для применения	18
18. Гарантии изготовителя	19
19. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость.....	19
20. Порядок подачи рекламаций.....	19
21. Утилизация	19
Приложение №1	20
Графические символы.....	23

1. Название, варианты исполнения

Набор реагентов для выявления полиморфизмов *C282T*, *T341C*, *C481T*, *G590A*, *A803G*, *G857A* в гене человека *NAT2* методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («ГенТест-М NAT2»).

Набор реагентов «ГенТест-М NAT2» выпускается в одном варианте исполнения.

2. Сведения, необходимые для эксплуатации

Внимательно изучите инструкцию перед применением набора реагентов. Все сведения, необходимые для применения (эксплуатации) набора реагентов «ГенТест-М NAT2», приведены в настоящей инструкции. Другие документы по эксплуатации, кроме инструкции, не предусмотрены.

3. Назначение, область применения

Только для применения в научно-исследовательских целях.

Не для применения в медицине или ветеринарии.

Набор реагентов «ГенТест-М NAT2» предназначен для качественного определения полиморфизмов *C282T* (rs1041983), *T341C* (rs1801280), *C481T* (rs1799929), *G590A* (rs1799930), *A803G* (rs1208), *G857A* (rs1799931) в гене человека *NAT2*.

Таблица 1 – определяемые полиморфизмы

Ген	Полиморфизм	Номенклатура HGVS	Идент-р dbSNP	Фланкирующая последовательность
NAT2	<i>C282T</i>	NG_012246.1:g.14041C>T NM_000015.2:c.282C>T NP_000006.2:p.Tyr94=	rs1041983	ATGTTAGGAGGGTATTTTTC[С/Т] ATCCCTCCAGTTAACAAATA
	<i>T341C</i>	NG_012246.1:g.14100T>C NM_000015.2:c.341T>C NP_000006.2:p.Ile114Thr	rs1801280	CCTTCTCCTGCAGGTGACCA[Т/С] TGACGGCAGGAATTACATTTG
	<i>C481T</i>	NG_012246.1:g.14240C>T NM_000015.2:c.481C>T NP_000006.2:p.Leu161=	rs1799929	AAGAGAGAGGAATCTGGTAC[С/Т] TGGACCAAATCAGGAGAGAG
	<i>G590A</i>	NG_012246.1:g.14349G>A NM_000015.2:c.590G>A NP_000006.2:p.Arg197Gln	rs1799930	CTTATTTACGCTTGAACCTC[С/А] AACCAATTGAAGATTTTGAGT
	<i>A803G</i>	NG_012246.1:g.14562G>A NM_000015.2:c.803G>A NP_000006.2:p.Arg268Lys	rs1208	AGAGGTTGAAGAAGTGTCTGA[А/С] AAATATATTTAAGATTTCTCT
	<i>G857A</i>	NG_012246.1:g.14616G>A NM_000015.2:c.857G>A NP_000006.2:p.Gly286Glu	rs1799931	CGTGCCCAAACCTGGTGTATG[С/А] ATCCCTTACTATTTAGAATA

4. Состав, форма выпуска

Исключен непосредственный или опосредованный контакт с пользователем (телом человека) при соблюдении требований инструкции по применению.

Таблица 2 – состав и форма выпуска

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПЦР-смесь М	3.6 мл	6 пробирок по 0.6 мл	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит Taq-полимеразу, смесь нуклеотид-трифосфатов, Mg ²⁺ и реакционный буфер.
Олиго-смесь М NAT2 C282T	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>NAT2</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы полиморфизма <i>C282T</i> (rs1041983).
Олиго-смесь М NAT2 T341C	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>NAT2</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы полиморфизма <i>T341C</i> (rs1801280).
Олиго-смесь М NAT2 C481T	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>NAT2</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы полиморфизма <i>C481T</i> (rs1799929).
Олиго-смесь М NAT2 G590A	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>NAT2</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы полиморфизма <i>G590A</i> (rs1799930).
Олиго-смесь М NAT2 A803G	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>NAT2</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы полиморфизма <i>A803G</i> (rs1208).
Олиго-смесь М NAT2 G857A	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>NAT2</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы полиморфизма <i>G857A</i> (rs1799931).

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПКО-1 ГОМозигота	0.6 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бесцветная цвета умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит смесь синтетических матриц ДНК, содержащих последовательности генотипов 282 CC, 341 TT, 481 CC, 590 GG, 803 AA, 857 GG. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипов.
ПКО-2 ГОМозигота	0.6 мл	1 пробирка		Содержит смесь синтетических матриц ДНК, содержащих последовательности генотипов 282 TT, 341 CC, 481 TT, 590 AA, 803 GG, 857 AA. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипов.
ПКО-3 ГЕТерозигота	0.6 мл	1 пробирка		Содержит смесь синтетических матриц ДНК, содержащих последовательности генотипов 282 CT, 341 TC, 481 CT, 590 GA, 803 AG, 857 GA. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипов.
Вода деионизированная	9 мл	6 пробирок по 1.5 мл	Жидкость прозрачная бесцветная.	Контрольный образец без ДНК для подтверждения отсутствия контаминации. Для приготовления реакционных смесей

5. Количество анализируемых образцов, кратность применения

Набор рассчитан на 100 реакций. Набор реагентов позволяет проанализировать от 10 до 44 образцов, каждый в двух повторностях. Количество образцов определяется форматом постановки и степенью загрузки 96-луночного амплификатора ПЦР-РВ. Максимальное количество анализируемых образцов достигается при анализе всех образцов одновременно по одному полиморфизму и при полной загрузке 96-луночного амплификатора. Набор реагентов рассчитан на однократное, в том числе дробное, использование.

6. Принцип действия

Принцип метода (принцип действия) основан на полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени.

Полимеразная цепная реакция включает в себя две стадии. На первой стадии анализа ДНК происходит амплификация целевого фрагмента ДНК с участием специфических праймеров, образуется ампликон («ПЦР-смесь М»; «Олиго-смесь М»). Амплификация проходит вне зависимости от аллельного варианта. На второй стадии анализа ДНК происходит определение генотипа путем температурного плавления дуплекса: детектирующий зонд – ампликон («ПЦР-смесь М»; «Олиго-смесь М»). Температура плавления дуплекса, образованного зондом и «аллелем 1» отличается от температуры плавления дуплекса, образованного зондом и «аллелем 2». ДНК, содержащая оба аллеля, имеет две температуры плавления.

Для контроля качества результатов используются реакции контрольного образца без ДНК и реакции с ПКО-1,2,3.

7. Научная обоснованность анализа

Ген *NAT2* кодирует N-ацетил-трансферазу 2. Нуклеотидные замены *C282T*, *T341C*, *C481T*, *G590A*, *A803G* и *G857A* в этом гене приводят к изменению скорости ацетилирования изониазида, сульфаниламида, гидралазина, новокаинамида, амринона, кофеина, аминоклоротимиды, дапсона, натрия аминосалицилата, нитразепама, бензидина, аминофлюорена, 4-аминобифенила, β-нафтиламина, 2-аминофлюорена, 2-аминоантрацена, серотонина, гистамина, дофамина и др. веществ. Носительство различных сочетаний аллелей приводит к нарушениям метаболизма субстратов *NAT2*, и в том числе это может приводить к индивидуальной непереносимости фармакологических препаратов, соединений, поступающих с пищей, аномалиям работы нервной и иммунной систем и другим негативным последствиям, влияющим на качество жизни.

8. Аналитические характеристики

Наименование показателя	Характеристика и норма
Предел обнаружения	1.0 нг/мкл
Аналитическая специфичность (под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов «ГенТест-М <i>NAT2</i> » специфически определять генотипы полиморфизмов <i>C282T</i> (rs1041983), <i>T341C</i> (rs1801280), <i>C481T</i> (rs1799929), <i>G590A</i> (rs1799930), <i>A803G</i> (rs1208), <i>G857A</i> (rs1799931) в гене человека <i>NAT2</i> на фоне всего остального генома человека, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах*)	Детекция генотипов <i>282 CC</i> , <i>341 TT</i> , <i>481 CC</i> , <i>590 GG</i> , <i>803 AA</i> , <i>857 GG</i> в реакциях с ПКО-1 ГОМозигота Детекция генотипов <i>282 TT</i> , <i>341 CC</i> , <i>481 TT</i> , <i>590 AA</i> , <i>803 GG</i> , <i>857 AA</i> в реакциях с ПКО-2 ГОМозигота Детекция генотипов <i>282 CT</i> , <i>341 TC</i> , <i>481 CT</i> , <i>590 GA</i> , <i>803 AG</i> , <i>857 GA</i> в реакциях с ПКО-3 ГЕТерозигота Генотип не определяется в образцах ОКВ и в контрольном образце без ДНК

* Для подтверждения специфичности используются: 1) образцы предприятия ПКО: ПКО-1 ГОМозигота, ПКО-2 ГОМозигота, ПКО-3 ГЕТерозигота, верифицированные по Сэнгеру; 2) ОКВ и контрольный образец без ДНК, которые представляют собой деионизированную воду, свободную от ДНК.

9. Ограничения метода

9.1 Информация об интерферирующих веществах

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов была проведена оценка влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале.

Для проведения испытаний использовалась ДНК, выделенная из контрольных образцов предприятия (далее КОП), не содержащих потенциально интерферирующие вещества из Таблицы 3.

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале, каждое вещество из Таблицы 3 испытывалось в максимальной концентрации, которая, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов, а также в концентрации, превышающей нормальное содержание этих веществ в биоматериале, с целью установления концентрации, влияющей на результат работы набора реагентов.

Результаты приведены в Таблице 3. Каждое вещество в заданной концентрации добавлялось к КОП на этапе выделения ДНК (использовался набор реагентов «ЭкстрактДНК-1», кат.№ R1002, производства ООО «НОМОТЕК»). Выделенная ДНК была генотипирована испытуемым набором реагентов. По результатам сравнения генотипов образцов с и без добавления потенциально интерферирующих веществ, делался вывод о влиянии потенциально интерферирующих веществ на набор реагентов.

Потенциально интерферирующие вещества в концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияют на его специфичность. Влияние потенциально интерферирующих веществ на результат работы набора реагентов установлено только при увеличении концентрации веществ до концентраций, превышающих их известную максимальную концентрацию в биоматериале.

Таблица 3 – концентрации потенциально интерферирующих веществ

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация потенциально интерферирующих веществ, встречающаяся в биоматериале при нормальном использовании набора реагентов	Установленные концентрации потенциально интерферирующих веществ, влияющие на результат работы набора реагентов
Гемоглобин	220 г/л	400 г/л
Лактоферрин	200 мкг/мл	300 мкг/мл
IgG	17 г/л	60 г/л
Билирубин общий	160 мкмоль/л	500 мкмоль/л
Холестерин общий	12 ммоль/л	40 ммоль/л
Общие триглицериды	11.3 ммоль/л	50 ммоль/л

9.2 Совместимость с приборами

Набор реагентов «ГенТест-М NAT2» совместим с приборами:

1. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнение: C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFХ96 (Optical Reaction Module CFХ96) (Производитель: Био-Рад Лабораториз, Инк, США);
2. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями, исполнение: StepOnePlus (Производитель: Лайф Текнолоджис Корпорейшн, США);
3. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500 (Производитель: Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд, Сингапур).

10. Меры предосторожности

10.1 Общие

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению, только в научно-исследовательских целях.
- Набор реагентов не содержит факторы инфекционной и микробной опасности.
- Набор содержит факторы токсикологической опасности, требующие обеспечение специальных мер безопасности. Компоненты с такими веществами имеют предупредительную маркировку:



10.2 Для оператора

- При проведении исследования необходимо строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в лабораториях при манипуляциях с биологическим материалом человека, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей.
- При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.
- Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к используемым электрическим приборам; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Для предотвращения контаминации этапы подготовки к амплификации (ПЦР) и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими необходимыми принадлежностями. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Примечание: Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории описаны в Приложении №1 данной инструкции по применению.

При работе с Набором реагентов соблюдать следующие правила:

- Использовать одноразовые нитриловые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.

- Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует утилизировать согласно правилам, принятым в организации.
- Набор реагентов готов к применению согласно инструкции по применению. Применять набор реагентов строго по назначению.
- Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации
- К работе с набором реагентов допускается только обученный персонал.
- Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать Набор реагентов по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

11. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки

Каждая зона ПЦР-лаборатории должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами (см. Приложение №1).

Замена амплификатора и пробирок для амплификации на оборудование и материалы с аналогичными характеристиками не допускается!

Перечень материалов и оборудования, необходимых для проведения исследования:

- ПЦР-бокс для приготовления реакционной смеси;
- ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР;
- Комплект дозаторов переменного объема и наконечников с фильтром, позволяющих отбирать объемы жидкостей от 2 до 1000 мкл;
- Амплификатор детектирующий:
 - Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнение: C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (Производитель: Био-Рад Лабораториз, Инк, США);
 - Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями, исполнение: StepOnePlus (Производитель: Лайф Текнолоджис Корпорейшн, США);
 - Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500 (Производитель: Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд, Сингапур).
- Пробирки для амплификации 0.1 мл (Кат. № SSI-3248-00, Производитель: SSI, США – для прибора StepOnePlus) или 0.2 мл (Кат. № SSI-3247-00, Производитель: SSI, США – для приборов CFX96 и 7500);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и 2.0 мл;
- Мини-центрифуга/вортекс;
- Термостат.

12. Биологический материал

ДНК, выделенная из периферической крови, буккального эпителия, слюны набором реагентов «ЭкстрактДНК-1» (кат.№ R1002) или «ЭкстрактДНК-2» (кат.№ R1003) производства ООО «НОМОТЕК».

Для анализа одного образца по одной мутации необходимо 10 мкл препарата ДНК. Не проводить определение генотипа по смеси ДНК, выделенной из разных образцов.

Хранить и транспортировать препарат ДНК при температуре от -28 до -10 °С в течение 1 месяца, с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

13. Протокол анализа образца

13.1 Подготовка компонентов. Приготовление реакционных смесей

1. В ПЦР-боксе для приготовления реакционных смесей разморозить при температуре от +15 до +30 °С компоненты: «ПЦР-смесь М», «Вода деионизированная» и «Олиго-смесь М» (одновременно все шесть или только некоторые из них в зависимости от анализируемых полиморфизмов).

2. Содержимое пробирок тщательно перемешать четырехкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортексе в течение 10 с, не допуская образования пены; сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

3. Рассчитать необходимый объем компонентов для реакционной смеси, исходя из числа исследуемых образцов и согласно Таблице 4.

Дополнительно необходимо провести реакции с:

- ПК0-1,2,3;
- Контрольным образцом без ДНК.

Если при выделении ДНК были получены образцы ОКВ, то при постановке ПЦР включить их вместе с исследуемыми образцами, выделенными одновременно с ними.

Каждую реакцию с контрольными и исследуемыми образцами необходимо выполнить в двух повторностях.

Таблица 4 – расчет количества компонентов (контрольные образцы и выполнение всех образцов в двух повторностях учтены в формуле)

Для каждой мутации готовится реакционная смесь, в состав которой входит только одна из шести олиго-смесей М.

Компонент реакционной смеси	Количество компонента, мкл (где N – анализируемые образцы, X – ОКВ, 4 – ПК0-1,2,3 и КО без ДНК)
Вода деионизированная	$10.5 \times 2(N+X+4)$
ПЦР-смесь М	$5.25 \times 2(N+X+4)$
Олиго-смесь М	$5.25 \times 2(N+X+4)$

4. Приготовить реакционную смесь.

Менять наконечники между компонентами!

5. Тщательно перемешать реакционную смесь встряхиванием на вортексе в течение 10 с; сбросить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 5 с.

6. Подготовить пробирки для ПЦР (стрипы; 1 стрип – 8 пробирок): установить в штатив, промаркировать.

Не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. Маркировку наносить на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.

Перед внесением образцов в пробирки для ПЦР (п. 7-13) ознакомиться со схемой расположения исследуемых образцов, ПКО-1,2,3, ОКВ и Контрольного образца без ДНК относительно друг друга.

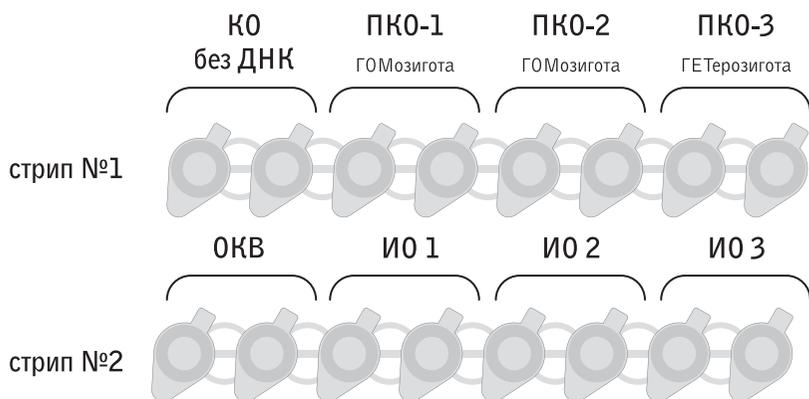


Рисунок 1 – схема расположения пробирок для ПЦР при исследовании 3 образцов. При изменении количества исследуемых образцов сохранять расположение пробирок для ПЦР и порядок внесения (п. 7-13) исследуемых образцов, ПКО-1,2,3, ОКВ и Контрольного образца без ДНК относительно друг друга. ИО – исследуемый образец, ОКВ – отрицательный контроль выделения, КО без ДНК – контрольный образец без ДНК.

7. Внести по 20 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.

Менять наконечники между разными реакционными смесями!

8. Добавить по 5 мкл «Вода деионизированная», которая использовалась для приготовления реакционной смеси, в пробирки для ПЦР, соответствующие «Контрольному образцу без ДНК». Плотно закрыть крышки пробирок.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

9. Закрыть крышки других пробирок для ПЦР. Перенести все пробирки для ПЦР в ПЦР-бокс для внесения ДНК.

13.2 Подготовка контрольных образцов и ДНК.

Внесение образцов в пробирки для ПЦР

10. В ПЦР-боксе для внесения ДНК разморозить при температуре от +15 до +30 °С контрольные образцы ПКО-1,2,3.

11. Разморозить/прогреть при температуре +50 °С исследуемые образцы ДНК и ОКВ.

12. Все образцы перемешать встряхиванием на вортексе, сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

13. Добавить по 5 мкл ОКВ в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

14. Добавить по 5 мкл ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

15. Добавить по 5 мкл контрольных образцов ПК0-1,2,3 в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения контрольного образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

16. Проверить плотность закрытия крышек пробирок.

17. Перемешать встряхиванием содержимое пробирок для ПЦР, не допуская образования пены.

18. Сбросить капли центрифугированием в течение 10 с.

Проведение ПЦР

19. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

20. Запустить программное обеспечение амплификатора. Открыть созданный ранее шаблон или ввести параметры:

- программа амплификации (одинакова для каждого прибора)

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация	95	3 мин	—
Амплификация 10 циклов	95	10 с	—
	62	30 с	—
Амплификация 40 циклов	95	10 с	—
	62	30 с	√
Формирование дуплекса	95	3 мин	—
	20	2 мин	—
Плавление дуплекса	От 20 до 70 °С с увеличением температуры на 0.5 °С каждые 10 с		√

Если при запуске программы амплификации на приборе 7500 появляется сообщение об ошибке «Hold Duration Too Short for Read», увеличьте время считывания сигнала на этапе плавления дуплекса до 30 с (такая ошибка возможна при использовании более ранней версии ПО, чем «7500 Software v2.3»).

- создать разметку плашки в соответствии с установленными пробирками в блок амплификатора:
 - Для всех образцов, включая контрольные, выбрать канал детекции FAM;

Внимание!

Не использовать гаситель и пассивный референсный краситель!

- В поле "Target" ввести название исследуемой мутации,
- В поле "Sample Name" ввести названия исследуемых и контрольных образцов. Не вводить одинаковые названия для разных образцов;
- запустить программу амплификации.

14. Анализ данных

1. Настройки: Задать параметр «Пороговый уровень» (Threshold): для прибора CFX96 ввести значение 50, для прибора StepOne Plus ввести значение 2500, для прибора 7500 ввести значение 5000.*

2. Контроль качества ПЦР:

2.1 Анализ Контрольного образца без ДНК и ОКВ

$Cq \geq 38$ или Cq не определяется
и
График сигнала флуоресценции
не имеет S-образной формы

→ НЕТ

Результаты эксперимента признаются
недействительными

↓ ДА

2.2 Анализ контрольных образцов ПКО-1,2,3

Для образцов ПКО-1,2,3 $Cq \leq 26$

→ НЕТ

Результаты эксперимента признаются
недействительными

↓ ДА

Для образцов ПКО-1,2,3 форма пиков и
их температуры плавления соответствуют
значениям, заявленным в Таблице 5

→ НЕТ

Результаты эксперимента признаются
недействительными

3. Анализ исследуемых образцов:

Определение генотипов исследуемых образцов

Значение $Cq \leq 30^{**}$

→ НЕТ

Образец анализировать нельзя

↓ ДА

Форма пиков и их температуры
плавления совпадают с ПКО-1

→ ДА

Генотип 282 CC, 341 TT, 481 CC, 590 GG,
803 AA, 857 GG

↓ НЕТ

Форма пиков и их температуры
плавления совпадают с ПКО-2

→ ДА

Генотип 282 TT, 341 CC, 481 TT, 590 AA,
803 GG, 857 AA

↓ НЕТ

Форма пиков и их температуры
плавления совпадают с ПКО-3

→ ДА

Генотип 282 CT, 341 TC, 481 CT, 590 GA,
803 AG, 857 GA

↓ НЕТ

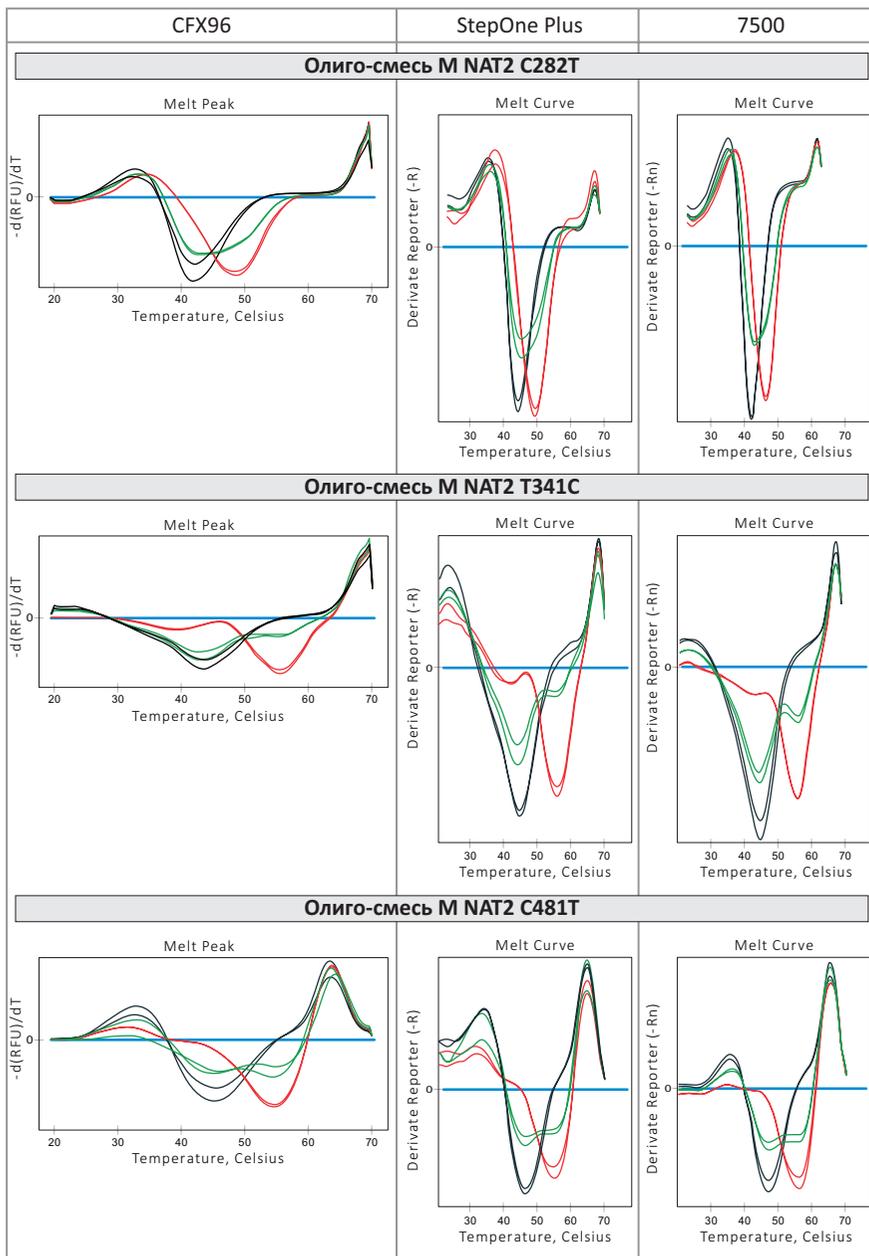
→ НЕТ

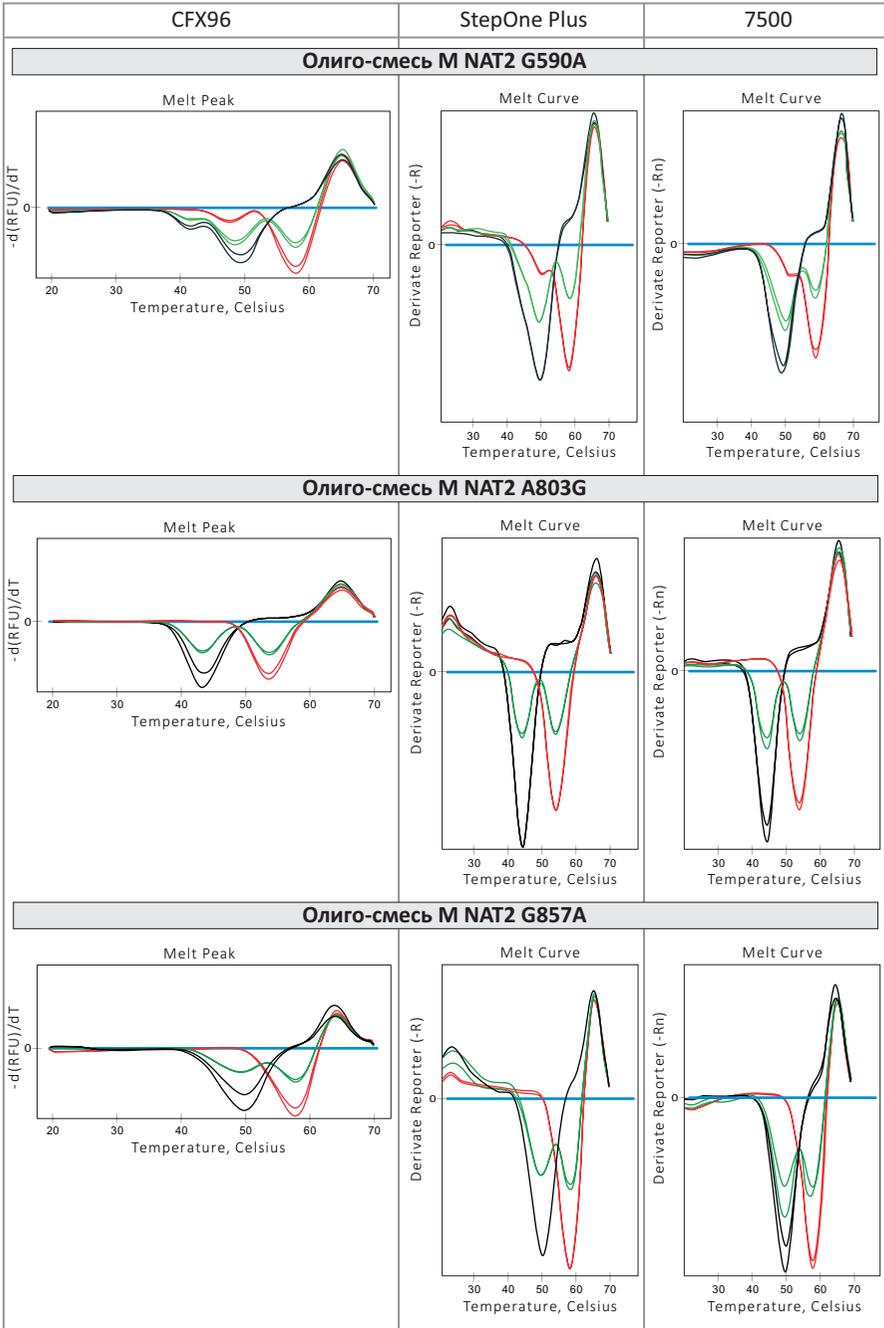
Образец анализировать нельзя

* При необходимости изменить значения Baseline так, чтобы часть графика флуоресценции до начала экспоненциального роста сигнала стала параллельна оси абсцисс и близка к нулю по оси ординат.

** Если не выполняется условие $Cq \leq 30$, значит в исследуемом образце концентрация ДНК меньше, чем предел обнаружения (1 нг/мкл) набора реагентов «ГенТест-М NAT2» и образец анализировать нельзя.

Таблица 5 – Форма пиков ПК0-1,2,3 и их температуры плавления (Целевые пики ПК0-1,2,3 находятся в диапазоне от 40 до 65 °С ниже оси абсцисс; графики ПК0-1 ГОМозигота выделены черным, графики ПК0-2 ГОМозигота – красным, графики ПК0-3 ГЕТерозигота – зеленым).





15. Условия транспортирования, хранения и использования

15.1 Набор реагентов «ГенТест-М NAT2» разрешается транспортировать всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

15.2 Транспортирование набора реагентов «ГенТест-М NAT2» осуществляется в пенопластовых термоконтейнерах с хладоэлементами в течение 5 суток при температуре от -28 до +8 °С.

15.3 Хранение набора реагентов «ГенТест-М NAT2» до и после первого вскрытия осуществляется при температуре от -28 до -10 °С.

15.4 Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, использованию не подлежит.

16. Срок годности

Срок годности 12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортирования и хранения. Набор реагентов или полученные в ходе использования смеси растворов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

17. Критерии непригодности набора реагентов для применения

Не использовать «ГенТест-М NAT2», если применим хотя бы один критерий непригодности:

- при первом вскрытии обнаружено повреждение фасовочной тары компонентов;
- нет возможности плотно закрыть фасовочную тару компонентов или обнаружены протечки;
- неполная комплектность, в том числе в результате применения;
- внешний вид компонентов не соответствует описанию;
- нарушены условия хранения;
- истек срок годности;
- компоненты контаминированы ДНК человека;
- изготовитель сообщил об отзыве производственной серии, к которой относится данный набор реагентов (посредством объявления на сайте www.nomotech.ru или иным способом).

18. Гарантии изготовителя

Предприятие-изготовитель ООО «НОМОТЕК» при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования набор реагентов «ГенТест-М NAT2» гарантирует:

- соответствие набора реагентов требованиям ТУ 20.59.52.199-016-11248074-2018;
- гарантийный срок хранения в упаковке – 12 месяцев со дня изготовления.

По истечению срока годности набор реагентов и все его компоненты применению не подлежат.

19. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость

19.1 Контроль качества набора реагентов осуществляется ОТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 20.59.52.199-016-11248074-2018.

Предприятие-изготовитель проводит приемо-сдаточные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик, внешнего вида, комплектности, упаковки, маркировки, а также проводит контроль качества сырья и компонентов.

19.2 Метрологическая прослеживаемость компонентов набора ПК0-1 ГОМозигота, ПК0-2 ГОМозигота, ПК0-3 ГЕТерозигота обеспечена до контрольных образцов предприятия, верифицируемых секвенированием по методу Сэнгера.

20. Порядок подачи рекламаций

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться:

- ООО «НОМОТЕК» 117997 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к.16;
- md-support@nomotech.ru – техническая поддержка.

При подаче рекламации необходимо исключить низкое качество биоматериала, ошибку измерения, ошибку выполнения протокола, нарушение условий транспортирования и хранения. Если все указанные факторы исключены, необходимо обратиться в службу технической поддержки.

21. Утилизация

21.1 Наборы реагентов «ГенТест-М NAT2», пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

21.2 Уничтожение наборов реагентов «ГенТест-М NAT2» осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

Приложение №1

Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории и правила ее организации:

- Зонирование
- Направление потока материалов и персонала
- Размещение оборудования и уборочного инвентаря

Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории

- Однонаправленность потока персонала и материалов.
- Технологическая одежда должна быть строго индивидуальна.
- Всегда использовать перчатки. Не прикасаться к поверхностям, оборудованию, ручкам дверей, холодильников и т.д. без перчаток.
- Не перемещать при работе, уборке помещений оборудование даже в пределах одной зоны.
- Не выходить за пределы зоны в технологической одежде.
- Маркировать используемые реактивы.
- Хранить используемые реактивы (вскрытые наборы реагентов) отдельно от не использовавшихся.
- Хранить материалы, содержащие ДНК отдельно от реактивов, использующихся для приготовления реакционной смеси.
- Выделение ДНК, приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
- При работе с дозаторами использовать наконечники с фильтром. Для каждой операции менять наконечник.
- Для хранения дозаторов использовать специальную стойку.
- После перемещения пробирок всегда осаждают капли со стенок на мини-центрифуге. Избегать касания внутренней поверхности пробирок и крышек наконечником.
- Перед и после работы проверить исправность оборудования, убрать рабочее место. Для уборки ПЦР-бокса в т.ч. использовать ультрафиолет.
- После работы утилизировать использованные материалы – наконечники, пробирки и т.д. согласно регламенту лаборатории.
- Пробирки с ПЦР-продуктом не открывать в зоне №4. Для утилизации пробирок с ПЦР-продуктом в зоне №4 поместить пробирки в пакет, пакет закрыть, утилизировать.

Зонирование.

ПЦР-лаборатория для ПЦР-РВ должна включать минимальный набор рабочих зон:

- Зона №1 – для работы с геномной ДНК (выделение ДНК, подготовка образцов)
- Зона №2 – для приготовления реакционных смесей (изолирована от источника ДНК)
- Зона №3 – для внесения ДНК в реакционную смесь
- Зона №4 – для проведения ПЦР (место нахождения амплификаторов)

При необходимости возможно размещение зон №2 и №3 в одном помещении при соблюдении разделения процессов приготовления реакционных смесей и внесения ДНК в разных ПЦР-боксах.

Для работы с большим потоком биологического материала следует создать дополнительную зону № 1а для его приемки, регистрации, разбора, первичной обработки.

Для работы с ПЦР-продуктом необходимо создать дополнительную зону №5 – для манипуляций с ПЦР-продуктом (электрофорез, подготовка образцов перед секвенированием).

Перед каждой зоной должен быть оборудован санпропускник – для смены одежды на технологическую, хранения уборочного инвентаря.

Направление потока материалов и персонала.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока материалов. В зону №2 не должны попадать материалы из других зон. Для других зон действует принцип: материалы, побывавшие в зонах с большим номером, не должны перемещаться в обратном направлении. Под материалами следует понимать: пробирки, штативы, пакеты, документы и т.п.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока персонала, в т.ч. обслуживающего персонала. Люди, побывавшие в зонах с большим номером, могут перемещаться в обратном направлении только при соблюдении порядка подготовки персонала к работе (мытьё рук, смена комплекта одежды и т.д.). При работе в зоне №5 следует планировать рабочий процесс так, чтобы в этот день не возвращаться в другие зоны. Все находящиеся в лаборатории должны в каждой зоне менять одежду на технологическую: обувь, халат, шапочка, маска, перчатки, нарукавники. Технологическая одежда строго не должна перемещаться между зонами.

Размещение оборудования и уборочного инвентаря.

Каждая зона должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами. Минимальный список стационарного оборудования в зонах ПЦР-лаборатории:

- Зона №1а – центрифуга, штативы, вортекс, комплект дозаторов, комплект инструментов для работы с материалом, место для хранения материала;
- Зона №1 – ПЦР-бокс для выделения ДНК, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, термостат, штативы, морозильная камера, холодильная камера;
- Зона №2 – ПЦР-бокс для подготовки реакционной смеси, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона №3 – ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, термостат, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона №4 – амплификатор, центрифуга с ротором для стрипов и плашек;
- Зона №5 – ПЦР-бокс для работы с ПЦР-продуктом, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, штативы, прибор для проведения электрофореза, лабораторные весы, микроволновая печь, морозильная камера, холодильная камера.

Каждая зона должна быть снабжена индивидуальным уборочным инвентарем – ведро для мытья пола, швабра, тряпка для мытья пола, емкость и тряпки для мытья рабочих поверхностей, дезинфицирующие хлор- или перекись-содержащие средства. Уборочный инвентарь не должен перемещаться из одной зоны в другую.

Графические символы

	Номер по каталогу
	Код серии
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Использовать для приготовления реакционной смеси
	Только для научно-исследовательских целей
	Знак Общего количества тестов, которые могут быть выполнены с использованием реагентов, содержащихся в наборе
	Осторожно. Вредные для здоровья аллергические (раздражающие) вещества

Техническая поддержка: md-support@nomotech.ru

Изготовитель:

Общество с ограниченной ответственностью
«Новые Молекулярные Технологии» (ООО «НОМОТЕК»)

Фирменное наименование:

 **НОМОТЕК**

г. Москва, 119421

Проспект Ленинский, д. 111, корп. 1, пом. 34, эт. 3

Тел.: +7 (968) 333 43 85

www.nomotech.ru

I0013