

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ
№ ФСР 2010/08414

КардиоГенетика Гипертония

Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития артериальной гипертензии, методом ПЦР в режиме реального времени

Внимание! Перед первым использованием комплекта изучите Руководство по применению комплектов реагентов для определения генетических полиморфизмов методом ПЦР в режиме реального времени.

Комплект реагентов предназначен для определения генетических полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в препаратах ДНК человека, полученных из периферической крови.

Комплект предназначен для использования с амплификаторами детектирующими (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96.

Для получения ДНК из анализируемого материала рекомендуется использовать комплект реагентов для выделения ДНК ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Внимание! Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта. Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) производства ООО «НПО ДНК-Технология».

Состав (на 48 определений)

Реактив	Количество	
Реагенты, специфичные для данного комплекта		
1. ADD1: 1378 G>T (Gly460Trp)	960 мкл	1 пробирка
2. AGT: 704 T>C (Met235Thr)	960 мкл	1 пробирка
3. AGT: 521 C>T (Thr174Met)	960 мкл	1 пробирка
4. AGTR1: 1166 A>C	960 мкл	1 пробирка
5. AGTR2: 1675 G>A	960 мкл	1 пробирка
6. CYP11B2: -344 C>T	960 мкл	1 пробирка
7. GNB3: 825 C>T	960 мкл	1 пробирка
8. NOS3: -786 T>C	960 мкл	1 пробирка
9. NOS3: 894 G>C (Glu298Asp)	960 мкл	1 пробирка
Реагенты, универсальные для всех комплектов для определения генетических полиморфизмов		
• ПЦР-буфер	4,32 мл	1 флакон
• Taq-АТ полимеразы	216 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	8,64 мл	1 флакон

Инструкция по применению

1. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

Внимание! Одновременно с исследованием неизвестных образцов провести исследование отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. Инструкции к комплектам реагентов для выделения ДНК ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА).

- 1.1. Промаркировать необходимое количество пробирок для амплификации объемом 0,2 мл (количество анализируемых образцов + отрицательный контрольный образец «К-», умноженное на количество определяемых генетических полиморфизмов).

¹ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

² – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.

- 1.2. Встряхнуть пробирки со смесью для амплификации в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- 1.3. Внести в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации.
- 1.4. Встряхнуть пробирки с ПЦР-буфером и Taq-AT полимеразой в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- Внимание!** Taq-AT полимеразу доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
- 1.5. Приготовить в отдельной пробирке смесь ПЦР-буфера и Taq-AT полимеразы:
 10 × (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 0,5 × (N+1) мкл Taq-AT полимеразы,
 где N – количество промаркированных пробирок (количество анализируемых образцов, умноженное на количество определяемых генетических полиморфизмов).
 Закрыть крышку пробирки, встряхнуть пробирку в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- Внимание!** Смесь ПЦР-буфера и Taq-AT полимеразы готовить непосредственно перед использованием, не допускается её хранение.
- 1.6. Добавить в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и Taq-AT полимеразы.
- 1.7. Добавить в каждую пробирку по одной капле (20 мкл) минерального масла, закрыть крышки пробирок.
- 1.8. Добавить в соответствующие пробирки по 5,0 мкл анализируемого препарата ДНК, закрыть крышки пробирок.
- Внимание!** Во избежание контаминации следует вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольными барьерами.
- 1.9. Добавить в пробирки, предназначенные для «К–», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, закрыть крышки пробирок.
- 1.10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
- 1.11. Установить пробирки в блок детектирующего амплификатора, заполнить протокол, используя параметр «Тест» («Создать тест» при первом проведении анализа, «Добавить тест» при повторных исследованиях) в программном обеспечении прибора и запустить программу амплификации.
- При создании параметра «Тест» указать программу амплификации, приведённую в таблице 1, при заполнении п.7 «Критерий анализа полиморфизмов» указать специфические характеристики (генотип, температуры плавления) для определяемого полиморфизма, приведенные в таблице 2.

Таблица 1

Программа амплификации для амплификаторов детектирующих ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	2	00	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	5		Цикл
	67	0	10			
3	94	0	5	45		Цикл
	67	0	5			
4	25	0	30	1		Цикл
5*	25	0	15	50	√	Кривая плавления (указать параметры: Δt=1°C; T _{кон} =75°C)
6	10	Хранение		Хранение

* – при создании блока 5 отметить тип «Кривая плавления»

Генотипы и температуры плавления продуктов амплификации

Полиморфизм	Гомозигота FAM/FAM			Гомозигота HEX/HEX			Гетерозигота		
	Генотип	FAM, °C	HEX, °C	Генотип	FAM, °C	HEX, °C	Генотип	FAM, °C	HEX, °C
ADD1: 1378 G>T (Gly460Trp)	GG	54,1	49,6	TT	40,0	54,9	GT	52,8	54,8
AGT: 704 T>C (Met235Thr)	TT	59,0	45,3	CC	53,3	57,9	TC	57,7	56,4
AGT: 521 C>T (Thr174Met)	CC	56,0	47,8	TT	42,0	54,3	CT	55,2	52,9
AGTR1: 1166 A>C	AA	55,5	48,4	CC	45,5	56,5	AC	54,9	55,2
AGTR2: 1675 G>A	GG	52,0	45,8	AA	44,4	53,5	GA	52,0	52,8
CYP11B2: -344 C>T	CC	58,3	47,7	TT	42,5	55,2	CT	57,4	53,4
GNB3: 825 C>T	CC	55,0	52,8	TT	46,1	59,2	CT	54,9	58,4
NOS3: -786 T>C	CC	58,9	53,2	TT	42,0	59,1	CT	57,2	58,0
NOS3: 894 G>C (Glu298Asp)	GG	55,4	43,6	TT	48,5	55,3	GT	54,2	54,5

2. **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов. Интерпретация результатов подробно описана в Руководстве по применению комплектов реагентов для определения генетических полиморфизмов.

Условия хранения

Срок годности комплекта – 6 месяцев с даты изготовления.

Смесь для амплификации, ПЦР-буфер и минеральное масло следует хранить при температуре 2–8°C в защищённом от света месте в течение всего срока годности.

Taq-AT полимеразу хранить при температуре минус 20°C в течение всего срока годности.

Смесь ПЦР-буфера и Taq-AT полимеразы хранению не подлежит и должна быть приготовлена непосредственно перед проведением ПЦР.

По вопросам, касающимся качества комплекта для определения генетических полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

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

Тел./факс +7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

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

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