

Регистрационное удостоверение
 № ФСР 2010/08633

ФармакоГенетика Варфарин

Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом варфарина, методом ПЦР в режиме реального времени

Внимание! Перед первым использованием комплекта изучите общую Инструкцию 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 адекватную работу комплекта. Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Состав (на 48 определений)

Реактив	Количество	
Реагенты, специфичные для данного комплекта		
1. CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys)	960 мкл	1 пробирка
2. CYP2C9: A>C (Ile359Leu)	960 мкл	1 пробирка
3. CYP4F2: C>T (Val433Met)	960 мкл	1 пробирка
4. VKORC1: -1639 G>A	960 мкл	1 пробирка
Реагенты, универсальные для всех комплектов для определения генетических полиморфизмов		
• ПЦР-буфер	960 мкл	2 пробирки
• Taq-АТ полимеразы	96 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	3,84 мл	1 флакон

Инструкция по применению

1. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

Внимание! Одновременно с исследованием неизвестных образцов необходимо 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 по количеству анализируемых образцов и определяемых генетических полиморфизмов (количество анализируемых образцов с учетом отрицательного контрольного образца «К-», умноженное на количество определяемых генетических полиморфизмов).

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-АТ полимеразой в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

Внимание! Taq-АТ полимеразу доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

1.5. Приготовить в отдельной пробирке смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ полимеразы:

- 10 × (N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,5 × (N+1) мкл Taq-АТ полимеразы,

где N – количество промаркированных пробирок (количество анализируемых образцов, умноженное на количество определяемых генетических полиморфизмов).

Закрывать крышку пробирки, встряхнуть пробирку в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

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

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

Внимание! Смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы необходимо 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-АТ-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 детектирующего амплификатора, и запустить программу амплификации.

При создании параметра «Тест» указать программу амплификации, приведенную 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 (ООО «НПО ДНК-Технология») 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 °С; T _{кон} =75 °С)
6	10	Хранение		Хранение

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

Таблица 2

Генотипы и температуры плавления продуктов амплификации

Полиморфизм	Гомозигота FAM/FAM			Гомозигота HEX/HEX			Гетерозигота		
	Генотип	FAM, °С	HEX, °С	Генотип	FAM, °С	HEX, °С	Генотип	FAM, °С	HEX, °С
CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys)	CC	58,8	46,7	TT	51,0	56,0	CT	58,6	56,6
CYP2C9: A>C (Ile359Leu)	AA	57,4	48,4	CC	52,0	59,0	AC	56,6	58,5
CYP4F2: C>T (Val433Met)	CC	58,9	45,5	TT	49,9	55,3	CT	57,8	55,0
MKORC1: -1639 G>A	GG	55,2	49,2	AA	41,4	55,3	GA	54,2	54,7

2. **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96. Интерпретация результатов подробно описана в общей Инструкции 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°С в защищённом от света месте в течение всего срока годности.

Taq-АТ полимеразу хранить при температуре минус 20°С в течение всего срока годности.

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

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов 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/>