

Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с развитием гемохроматоза, методом ПЦР в режиме реального времени Генетика наследственных заболеваний. Гемохроматоз

Информация о комплекте

Назначение:

Комплект реагентов «Генетика наследственных заболеваний. Гемохроматоз» предназначен для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с развитием гемохроматоза. Полученные результаты могут быть использованы при диагностике наследственного гемохроматоза.

Метод:

Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени; анализ кривых плавления.

Материал для исследования:

Периферическая кровь.

Выделение ДНК:

Рекомендуются комплекты реагентов для выделения ДНК ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Особенности набора:

Одновременная детекция – в одной пробирке определяются два аллельных варианта генетического полиморфизма.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96; версия программного обеспечения не ниже 7.3.3.10, рекомендуемая версия 7.3.5.25.³

Внимание! Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании.

Количество определений:

48

Состав комплекта:

Реактив	Количество	
Комплект Генетика наследственных заболеваний. Гемохроматоз		
• Смеси для амплификации		
1. HFE: 187 C>G (H63D)	960 мкл	1 пробирка
2. HFE: 193 A>T (S65C)	960 мкл	1 пробирка
3. HFE: 845 G>A (C282Y)	960 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	1,44 мл	1 пробирка
• Таq-АТ-полимераза	72 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	2,88 мл	1 флакон

Каналы детекции аллельных вариантов

Название смеси для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
HFE: 187 C>G (H63D)	C	G	-	-	-
HFE: 193 A>T (S65C)	A	T	-	-	-
HFE: 845 G>A (C282Y)	G	A	-	-	-

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

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

³ – по мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»:

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

Инструкция по применению

1. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

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) (ООО «НПО ДНК-Технология»).

1.1. Промаркируйте для каждого определяемого полиморфизма необходимое количество пробирок для амплификации объёмом 0,2 мл (по одной для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-»).

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 15 пробирок для исследуемых образцов и 3 пробирки для «К-». Общее количество пробирок – 18.

1.2. Встряхните пробирки со смесью для амплификации в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

1.3. Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждого полиморфизма отдельным наконечником).

1.4. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-АТ-полимеразой в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

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

1.5. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-АТ-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

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

где N — количество промаркированных пробирок с учётом «К-».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов и один «К-». Промаркированных пробирок – 18. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы для 19 (18+1) пробирок, т.е. 190 мкл ПЦР-буфера + 9,5 мкл Taq-АТ-полимеразы.

1.6. Встряхните пробирку в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

Внимание! Смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием.

1.7. Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы.

Внимание! После добавления смеси ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп. 1.9 – 1.13.

1.8. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

1.9. **Примечание.** Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.

Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (3 шт. для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.

1.10. Внесите в пробирки, маркированные «К-», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

1.11. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.

1.12. Установите все пробирки в блок амплификатора детектирующего.

1.13. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл «HFE.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тесты «HFE_187_C>G », «HFE_193_A>T », «HFE_845_G>A » или используйте многотестовый режим, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. п.1.12) и проведите ПЦР.

Примечание. Тип пробирки для отрицательных контрольных образцов следует указывать как «Образец».

2. **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для амплификаторов детектирующих.

Условия хранения и эксплуатации

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

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

Срок годности комплекта – 6 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с развитием гемохроматоза, методом ПЦР в режиме реального времени (Генетика наследственных заболеваний. Гемохроматоз), 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/>

Приложение.

Таблица 1.

Генотипы и температуры плавления продуктов амплификации
(только для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96)

Полиморфизм	Гомозигота Fam/Fam			Гомозигота Hex/Hex			Гетерозигота		
	Генотип	Fam,°C	Hex,°C	Генотип	Fam,°C	Hex,°C	Генотип	Fam,°C	Hex,°C
HFE: 187 C>G (H63D)	CC	49,2	38,4	GG	34,1	49,3	CG	48,8	48,8
HFE: 193 A>T (S65C)	AA	61,5	52,4	TT	54,0	62,1	AT	60,3	60,5
HFE: 845 G>A (C282Y)	GG	57,3	49,3	AA	50,3	56,1	GA	57,2	55,3