



117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 640-17-71
Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15
(звонок по России бесплатный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru,
www.dna-technology.ru

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2010/08414

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

КардиоГенетика Тромбофилия (F2, F5)

Информация о комплекте

Назначение:

Комплект реагентов КардиоГенетика Тромбофилия (F2, F5) предназначен для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском осложнений при использовании гормональной контрацепции и проведении гормональной заместительной терапии, что позволяет оценить приемлемость их применения.

Метод:

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

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 комплекта:

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

Внутренний контроль (ВК) – позволяет оценить количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») (для ДТ-322 функция контроля количества ДНК в каждой пробирке не поддерживается); версия программного обеспечения не ниже 7.3.5.57, рекомендуемая версия 7.7.5.44³.

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

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):

от 2 часов.

Количество определений:

48

Состав комплекта:

Реактив	Количество	
Смеси для амплификации		
1.F2: 20210 G>A	960 мкл	1 пробирка
2.F5: 1691 G>A (Arg506Gln)	960 мкл	1 пробирка
ПЦР-буфер	480 мкл	2 пробирки
Тақ-АТ-полимераза	48 мкл	1 пробирка
Минеральное масло	960 мкл	2 пробирки

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/po/>

Изучите полную инструкцию перед началом работы

Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля

Название смеси для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
F2: 20210 G>A	G	A	-	BK	-
F5: 1691 G>A (Arg506Gln)	G	A	-	BK	-

Проведение анализа

1. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

Внимание! Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует $Cp \leq 32,0$ на канале детекции BK (Cy5). При использовании меньшего количества ДНК ($Cp > 32,0$) производитель не гарантирует корректную работу комплекта.

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

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 10 пробирок для исследуемых образцов и 2 пробирки для «К-». Общее количество пробирок – 12.

	F2: 20210 G>A	F5: 1691 G>A (Arg506Gln)
Образец 1	✓	✓
Образец 2	✓	✓
Образец 3	✓	✓
Образец 4	✓	✓
Образец 5	✓	✓
«К-»	✓	✓

- 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-AT-полимеразой в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

Внимание! Taq-AT-полимеразу необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

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

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

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

Например, необходимо проанализировать 5 образцов и один «К-». Промаркированных пробирок – 12. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы для 13 (12+1) пробирок, т.е. 130 мкл ПЦР-буфера + 6,5 мкл Taq-AT-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-AT-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием.

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

Внимание! После добавления смеси ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 1.8 - 1.13.

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

Изучите полную инструкцию перед началом работы

Внесите по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (2 шт. для каждого образца).

- 1.10. Внесите по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирки, маркированные «К-».
- 1.11. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
- 1.12. Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора.
- 1.13. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл «F2_F5.ini». Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующие тесты 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. 1.12) и проведите ПЦР.

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

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

Для образцов, прошедших ПЦР и содержащих достаточное для корректного анализа количество ДНК, программа определяет генотип исследуемого образца. Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК (менее 1,0 нг на амплификационную пробирку, $Cp > 32,0$ на канале детекции ВК) программа определяет недостоверный результат («нд»).

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

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

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

Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения реагентов, входящих в состав комплекта.

Срок годности комплекта – 6 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития тромбофилии, методом ПЦР в режиме реального времени (КардиоГенетика Тромбофилия (F2, F5)), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, корп.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),
E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:
http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Изучите полную инструкцию перед началом работы

Приложение

Таблица 1

Генотипы и температуры плавления продуктов амплификации (только для приборов 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
F2: 20210 G>A	GG	58,2	46,5	AA	50,0	57,8	GA	57,1	56,3
F5: 1691 G>A (Arg506Gln)	GG	53,6	47,8	AA	38,8	52,6	GA	52,4	52,5