

**В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов ОнкоГенетика в фасовке N**

Изучите полную инструкцию № 149-12 от 04.05.2018 перед началом работы. С текстом инструкции № 149-12 от 04.05.2018 по применению набора реагентов ОнкоГенетика в фасовке N можно ознакомиться на интернет-сайте компании «ДНК-Технология» по адресу: <http://www.dna-technology.ru/dnaproducts/reagents/med/> или обратитесь за полной инструкцией к представителю компании.

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом полимеразной цепной реакции

ОнкоГенетика

Вариант исполнения: ОнкоГенетика BRCA**Фасовка: для ручного дозирования (N)****Каталожный номер: R1-N927-N3/4**

Информация о наборе

Назначение:

Набор реагентов ОнкоГенетика предназначен для определения мутаций в генах BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAG, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA) и BRCA2 (6174delP), ассоциированных с риском развития онкопатологии (в том числе наследственных форм рака молочной железы и рака яичников), в препаратах ДНК человека, полученных из периферической крови, методом ПЦР в режиме реального времени.

Полученные результаты могут быть использованы для диагностики наследственных форм рака молочной железы или рака яичника, прогнозирования соответствующих наследственных форм рака у родственников первой линии.

Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

Метод:

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

Материал для исследования:

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Выделение ДНК:

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

Особенности комплекта:

Одновременная детекция – в одной пробирке определяются два аллельных варианта гена.

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

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.7.5.23³.

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

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):

от 2 часов.

Количество определений:

Набор реагентов предназначен для одnorазового применения и рассчитан на 48 определений.

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

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

³ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

Состав набора

Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смеси для амплификации BRCA1: 185delAG BRCA1: 4153delA BRCA1: 5382insC BRCA1: 3819delGTAAA BRCA1: 3875delGTCT BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly) BRCA1: 2080delA BRCA2: 6174delT	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	960 мкл
		1 пробирка	960 мкл
		1 пробирка	960 мкл
		1 пробирка	960 мкл
		1 пробирка	960 мкл
		1 пробирка	960 мкл
		1 пробирка	960 мкл
		1 пробирка	960 мкл
Полимераза ТехноТaq MAX	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
ПЦП-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 флакон	8,0 мл
K+1 [гомозиготный по нормальному аллелю]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	270 мкл
K+2 [гетерозиготный]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	270 мкл

Каналы детекции продуктов амплификации

Полиморфизм (наименование смеси для амплификации)	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля ⁴				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
BRCA1: 185delAG	N	m	-	BK	-
BRCA1: 4153delA	N	m	-	BK	-
BRCA1: 5382insC	N	m	-	BK	-
BRCA1: 3819delGTAAA	N	m	-	BK	-
BRCA1: 3875delGTCT	N	m	-	BK	-
BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly)	N	m	-	BK	-
BRCA1: 2080delA	N	m	-	BK	-
BRCA2: 6174delT	N	m	-	BK	-

Обозначения: N – нормальный аллель, m – мутантный аллель

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 набора.
- 1.1 Промаркируйте для каждого определяемого полиморфизма необходимое количество пробирок для амплификации объемом 0,2 мл: по одной пробирке – для каждого исследуемого образца, для отрицательного контрольного образца (K-), для положительных контрольных образцов «K+1 [гомозиготный по нормальному аллелю]» и «K+2 [гетерозиготный]».
- Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов. Для каждого полиморфизма нужно промаркировать 8 пробирок – 5 для исследуемых образцов, одну для «K-», одну для «K+1», одну для «K+2». Общее количество пробирок для всех восьми полиморфизмов – 64.

Образец	Смесь для амплификации / Номер промаркированной пробирки							
	BRCA1							BRCA2
	185 delAG	4153 delA	5382 insC	3819 delGTAAA	3875 delGTCT	300 T>G	2080 delA	6174 delT
1	1	2	3	4	5	6	7	8
2	9	10	11	12	13	14	15	16
3	17	18	19	20	21	22	23	24
4	25	26	27	28	29	30	31	32
5	33	34	35	36	37	38	39	40
K-	41	42	43	44	45	46	47	48
K+1	49	50	51	52	53	54	55	56
K+2	57	58	59	60	61	62	63	64

- 1.2 Встряхните пробирки со смесью для амплификации в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 1.3 Внесите во все промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждого полиморфизма отдельным наконечником).

- 1.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТақ МАХ в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТақ МАХ необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 1.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТақ МАХ. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 × (N+1) мкл ПЦР-буфера;
 - 0,5 × (N+1) мкл полимеразы ТехноТақ МАХ,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–», «K+1», «K+2».

Примечание: Необходимо проанализировать 5 образцов, «К–», «K+1», «K+2».

Промаркированных пробирок – 64.

Необходимо приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ МАХ для 65 (64+1) пробирок, т.е. нужно смешать 650 мкл ПЦР-буфера с 32,5 мкл полимеразы ТехноТақ МАХ.

- 1.6 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТақ МАХ в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

- 1.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТақ МАХ.

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

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ МАХ в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 1.9 – 1.14.

- 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.

Внесите в пробирки для исследуемых образцов по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК (кроме пробирок «К–», «K+1», «K+2»).

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

- 1.11 Внесите в пробирки, промаркированные для положительных контрольных образцов («K+1» и «K+2»), по 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца.

- 1.12 Центрифугируйте все пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 1.13 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

- 1.14 Запустите программное обеспечение к детектирующему амплификатору, выберите оператора, выберите режим «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл «BRCA.ini». При последующих постановках добавьте в протокол соответствующие тесты («BRCA1:185delAG»; «BRCA1:4153delA»; «BRCA1:5382insC»; «BRCA1:3819delGTAAA»; «BRCA1:3875delGTCT»; «BRCA1:300 T>G (Cys61Gly)»; «BRCA1:2080delA»; «BRCA2:6174delT») или используйте многотестовый режим («BRCA»), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (1.13) и проведите ПЦР.

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

ВНИМАНИЕ! Расположение пробирок на матрице термоблока должно строго соответствовать порядку установки пробирок в блоке. Для многотестового режима порядок установки пробирок должен строго соответствовать последовательности тестов в группе.

- 2** **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

В образцах, 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 («?»).

В бланке ответа по Онкогенетике в виде таблицы указываются генотипы образца по исследованным полиморфизмам (мутациям) с краткой характеристикой и заключением по результатам генотипирования.

ВНИМАНИЕ! В связи с высокой медицинской и социальной значимостью носительства полиморфизма (мутации) в гене BRCA1 или BRCA2 рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных образцов, начиная с этапа выделения ДНК.

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.

П р и м е ч а н и е – Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ при температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток.

Компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

Смеси для амплификации следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом полимеразной цепной реакции (ОнкоГенетика), 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.

Служба клиентской поддержки: 8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

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

http://www.dna-technology.ru/customer_support/