



ГенТест CYP2C19

Набор реагентов для выявления аллельных вариантов *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2C19*17* в гене человека *CYP2C19* методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («ГенТест CYP2C19»)

Кат. № R2001

Инструкция по применению

Сокращения и обозначения

<i>C_q</i>	Пороговый цикл
FAM	Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
HEX	Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
Номенклатура HGVS	Nomenclature – Human Genome Variation Society
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ПКО	Положительный контрольный образец
ОКВ	Отрицательный контроль выделения
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией накопления продукта амплификации ДНК в режиме реального времени
ТУ	Технические условия

Оглавление

Сокращения и обозначения.....	2
1. Название, варианты исполнения	4
2. Сведения, необходимые для эксплуатации	4
3. Назначение, область применения.....	4
4. Состав, форма выпуска	5
5. Количество анализируемых образцов, кратность применения.....	7
6. Принцип действия	7
7. Научная обоснованность анализа	9
8. Аналитические характеристики.....	9
9. Ограничения метода.....	10
10. Меры предосторожности.....	11
11. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки	13
12. Биологический материал	13
13. Протокол анализа образца	14
14. Анализ данных	17
15. Условия транспортирования, хранения и использования	17
16. Срок годности	17
17. Критерии непригодности набора реагентов для применения	18
18. Гарантии изготовителя	18
19. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость.....	18
20. Порядок подачи рекламаций.....	19
21. Утилизация	19
Приложение №1	20
Графические символы.....	23

1. Название, варианты исполнения

Набор реагентов для выявления аллельных вариантов *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2C19*17* в гене человека *CYP2C19* методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («ГенТест *CYP2C19*»).

Набор реагентов «ГенТест *CYP2C19*» выпускается в одном варианте исполнения.

2. Сведения, необходимые для эксплуатации

Внимательно изучите инструкцию перед применением набора реагентов. Все сведения, необходимые для применения (эксплуатации) набора реагентов «ГенТест *CYP2C19*», приведены в настоящей инструкции. Другие документы по эксплуатации, кроме инструкции, не предусмотрены.

3. Назначение, область применения

Только для применения в научно-исследовательских целях.

Не для применения в медицине или ветеринарии.

Набор реагентов «ГенТест *CYP2C19*» предназначен для качественного выявления аллельных вариантов *CYP2C19*2* (*rs4244285*), *CYP2C19*3* (*rs4986893*), *CYP2C19*17* (*rs12248560*) в гене человека *CYP2C19*.

Таблица 1 – определяемый аллельный вариант

Ген	Аллельный вариант	Номенклатура HGVS	Идент-р dbSNP	Фланкирующая последовательность
<i>CYP2C19</i>	<i>CYP2C19*2</i>	NG_008384.2:g.24154G>A NM_000769.2:c.681G>A NP_000760.1:p.Pro227=	<i>rs4244285</i>	TTCCCACTATCATTGATTA TTTCCC[G/A]GGAACCCAT AACAAATTACTTAAAA
	<i>CYP2C19*3</i>	NG_008384.2:g.22948G>A NM_000769.2:c.636G>A NP_000760.1:p.Trp212Ter	<i>rs4986893</i>	ACATCAGGATTGTAAGCA CCCCCTG[G/A]ATCCAGG TAAGGCCAAGTTTTTGC
	<i>CYP2C19*17</i>	NG_008384.2:g.4195C>T NM_000769.2:c.-806C>T	<i>rs12248560</i>	AAATTTGTGCTTCTGT CTCAAAG[C/T]ATCTCTG ATGTAAGAGATAATGCCG

4. Состав, форма выпуска

Исключен непосредственный или опосредованный контакт с пользователем (телом человека) при соблюдении требований инструкции по применению.

Таблица 2 – состав и форма выпуска

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПЦР-смесь	1.8 мл	3 пробирки	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит Taq-полимеразу, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg^{2+} и реакционный буфер.
Олиго-смесь CYP2C19*2	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена CYP2C19. Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизруемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы аллельного варианта CYP2C19*2.
Олиго-смесь CYP2C19*3	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена CYP2C19. Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизруемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы аллельного варианта CYP2C19*3.
Олиго-смесь CYP2C19*17	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена CYP2C19. Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизруемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотипы аллельного варианта CYP2C19*17.

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПКО-1 СУР2С19*2	0.13 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная синего цвета умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *1/*1 аллельного варианта СУР2С19*2. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.
ПКО-1 СУР2С19*3	0.13 мл	1 пробирка		Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *1/*1 аллельного варианта СУР2С19*3. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.
ПКО-1 СУР2С19*17	0.13 мл	1 пробирка		Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *1/*1 аллельного варианта СУР2С19*17. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.
ПКО-2 СУР2С19*2	0.13 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная зеленого цвета умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *2/*2 аллельного варианта СУР2С19*2. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.
ПКО-2 СУР2С19*3	0.13 мл	1 пробирка		Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *3/*3 аллельного варианта СУР2С19*3. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.
ПКО-2 СУР2С19*17	0.13 мл	1 пробирка		Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *17/*17 аллельного варианта СУР2С19*17. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПКО-3 СУР2С19*2	0.13 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается	Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *1/*2 аллельного варианта СУР2С19*2. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.
ПКО-3 СУР2С19*3	0.13 мл	1 пробирка	вспенивание при встряхивании.	Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *1/*3 аллельного варианта СУР2С19*3. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.
ПКО-3 СУР2С19*17	0.13 мл	1 пробирка		Содержит синтетическую матрицу ДНК с последовательностью генотипа *1/*17 аллельного варианта СУР2С19*17. Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипа.
Вода деионизированная	4.5 мл	3 пробирки	Жидкость прозрачная бесцветная.	Контрольный образец без ДНК для подтверждения отсутствия контаминации. Для приготовления реакционных смесей.

5. Количество анализируемых образцов, кратность применения

Набор рассчитан на 100 реакций. Набор реагентов позволяет проанализировать от 10 до 44 образцов, каждый в двух повторностях. Количество образцов определяется форматом постановки и степенью загрузки 96-луночного амплификатора ПЦР-РВ. Максимальное количество анализируемых образцов достигается при анализе всех образцов одновременно по одному полиморфизму и при полной загрузке 96-луночного амплификатора. Набор реагентов рассчитан на однократное, в том числе дробное, использование.

6. Принцип действия

Принцип метода (принцип действия) основан на полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени.

Амплификация целевого фрагмента ДНК осуществляется с помощью специфичных к исследуемому участку ДНК праймеров, входящих в состав «Олиго-смеси». Особенностью данного метода диагностики является то, что амплификация не зависит от наличия в пробе конкретного аллельного варианта гена и проходит во всех пробах, содержащих геномную ДНК человека.

Определение аллельного варианта основано на использовании конкурентных аллель-специфичных гидролизуемых зондов, меченных флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце. Зонды входят в состав компонента «Олиго-смесь».

Благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Таq-полимеразы (входит в состав «ПЦР-смесь») зонд гидролизуется и происходит разгорание флуоресцентного сигнала в результате пространственного разделения флуорофора и гасителя. Сигнал флуоресценции детектируется по каналам FAM и HEX. При этом, гидролиз зонда комплементарного ДНК с «аллелем 1» приводит к флуоресцентному сигналу по каналу FAM (Рисунок 1-А), а зонда комплементарного ДНК с «аллелем 2» – к флуоресцентному сигналу по каналу HEX (Рисунок 1-А), если же ДНК содержит оба аллеля, то сигнал флуоресценции детектируется по двум каналам одновременно (Рисунок 1-Б).

Для контроля качества результатов используются реакции с контрольными образцами «ПКО-1», «ПКО-2», «ПКО-3» и в качестве контрольного образца без ДНК – «Вода деионизированная».

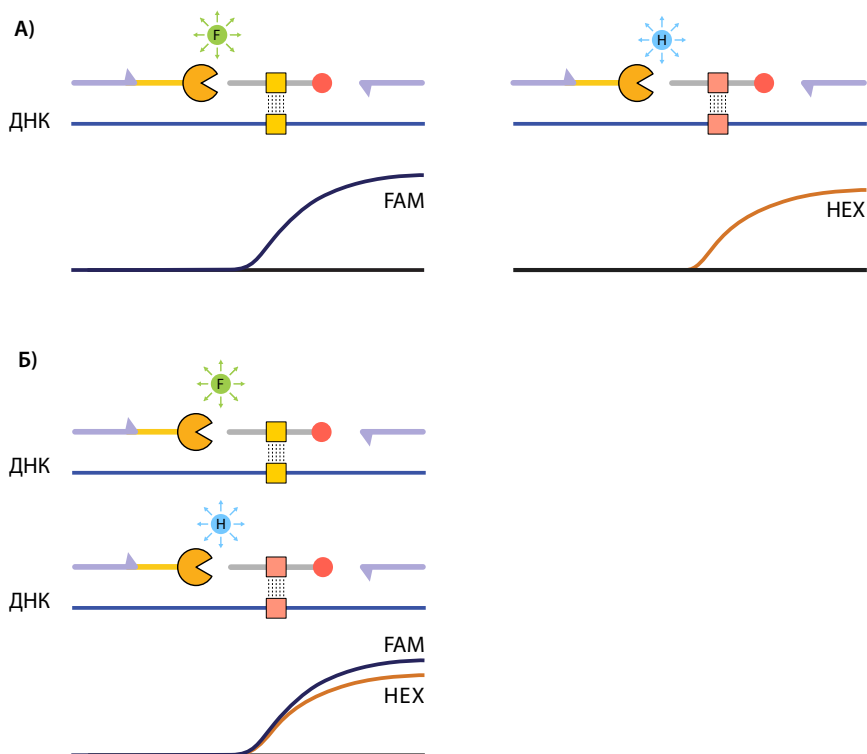


Рисунок 1 – детекция сигнала флуоресценции по каналам FAM и HEX.

На рисунках схематично изображена геномная ДНК (синяя линия) с детектируемой нуклеотидной заменой (желтый квадрат – аллель 1, розовый квадрат – аллель 2). На ДНК отжигается праймер (фиолетовая стрелка) и зонд (серая линия с нуклеотидной заменой, как в ДНК, содержащая по краям флуоресцентную метку – зеленый или синий круг, и гаситель флуоресценции – красный круг). Таq-полимераза (желтый круг) начинает синтезировать комплементарную нить ДНК (желтая линия), начиная с праймера. Дойдя до зонда, Таq-полимераза гидролизует флуоресцентную метку, после чего ее свечение детектируется прибором, что отображается как график роста сигнала флуоресценции.

7. Научная обоснованность анализа

Ген *CYP2C19* кодирует изофермент системы цитохрома P-450, отвечающий за биотрансформацию лекарственных средств и метаболизм эндогенных соединений. Однонуклеотидные замены G681A в *CYP2C19*2* и G636A в *CYP2C19*3* снижают каталитическую активность изофермента, а замена C806T в *CYP2C19*17* повышает ее. Изменение активности фермента нарушает метаболизм стероидных гормонов, жирных кислот, ретиноидов, желчных кислот, биогенных аминов, лейкотриенов и ксенобиотиков, антиагрегантов (клопидогрел), ингибиторов протонного насоса (омепразол, эзомеразол, лансопризол, пантопризол), антидепрессантов (амитриптилин, имипрамин, кломипрамин, циталопрам, доксепин, сертралин, дулоксетин, эсциталопрам, тримипрамин), противогрибковых ЛС (вориконазола) и др. веществ.

8. Аналитические характеристики

Наименование показателя	Характеристика и норма
Предел обнаружения	0.2 нг/мл
Аналитическая специфичность (под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов «ГенТест <i>CYP2C19</i> » специфически определять аллельные варианты <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i> , <i>CYP2C19*17</i> в гене человека <i>CYP2C19</i> на фоне всего остального генома человека, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах*)	Детекция генотипа *1/*1 аллельных вариантов <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i> , <i>CYP2C19*17</i> в реакциях с ПК0-1 Детекция генотипов *2/*2, *3/*3, *17/*17 аллельных вариантов <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i> , <i>CYP2C19*17</i> в реакциях с ПК0-2 Детекция генотипов *1/*2, *1/*3, *1/*17 аллельных вариантов <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i> , <i>CYP2C19*17</i> в реакциях с ПК0-3 Генотип не определяется в образцах ОКВ и контрольном образце без ДНК

* Для подтверждения специфичности используются: 1) образцы предприятия ПК0-1 *CYP2C19*2*, ПК0-2 *CYP2C19*2*, ПК0-3 *CYP2C19*2*, ПК0-1 *CYP2C19*3*, ПК0-2 *CYP2C19*3*, ПК0-3 *CYP2C19*3*, ПК0-1 *CYP2C19*17*, ПК0-2 *CYP2C19*17*, ПК0-3 *CYP2C19*17* (данные о метрологической прослеживаемости см. п.19) 2) ОКВ и контрольный образец без ДНК, которые представляют собой деионизированную воду свободную от ДНК.

9. Ограничения метода

9.1 Информация об интерферирующих веществах

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов была проведена оценка влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале.

Для проведения испытаний использовалась ДНК, выделенная из контрольных образцов предприятия (далее КОП), не содержащих потенциально интерферирующие вещества из Таблицы 3.

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале, каждое вещество из Таблицы 3 испытывалось в максимальной концентрации, которая, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов, а также в концентрации, превышающей нормальное содержание этих веществ в биоматериале, с целью установления концентрации, влияющей на результат работы набора реагентов.

Результаты приведены в Таблице 3. Каждое вещество в заданной концентрации добавлялось к КОП на этапе выделения ДНК (использовался набор реагентов «ЭкстрактДНК-1», кат.№ R1002, производства ООО «НОМОТЕК»). Выделенная ДНК была генотипирована испытуемым набором реагентов. По результатам сравнения генотипов образцов с и без добавления потенциально интерферирующих веществ, делался вывод о влиянии потенциально интерферирующих веществ на набор реагентов.

Потенциально интерферирующие вещества в концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияют на его специфичность. Влияние потенциально интерферирующих веществ на результат работы набора реагентов установлено только при увеличении концентрации веществ до концентраций, превышающих их известную максимальную концентрацию в биоматериале.

Таблица 3 – концентрации потенциально интерферирующих веществ

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация потенциально интерферирующих веществ, встречающаяся в биоматериале при нормальном использовании набора реагентов	Установленные концентрации потенциально интерферирующих веществ, влияющие на результат работы набора реагентов
Гемоглобин	220 г/л	400 г/л
Лактоферрин	200 мкг/мл	300 мкг/мл
IgG	17 г/л	60 г/л
Билирубин общий	160 мкмоль/л	500 мкмоль/л
Холестерин общий	12 ммоль/л	40 ммоль/л
Общие триглицериды	11.3 ммоль/л	50 ммоль/л

9.2 Совместимость с приборами

Набор реагентов совместим с прибором: «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнение: C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFX96» (Optical Reaction Module CFX96) (Производитель: Био-Рад Лабораториз, Инк, США).

10. Меры предосторожности

10.1 Общие

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению, только в научно-исследовательских целях.
- Набор реагентов не содержит факторы инфекционной и микробной опасности.
- Набор содержит факторы токсикологической опасности, требующие обеспечение специальных мер безопасности. Компоненты с такими веществами имеют предупредительную маркировку:



10.2 Для оператора

- При проведении исследования необходимо строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в лабораториях при манипуляциях с биологическим материалом человека, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей.
- При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.
- Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к используемым электрическим приборам; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Для предотвращения контаминации этапы подготовки к амплификации (ПЦР) и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими необходимыми принадлежностями. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Примечание: Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории описаны в Приложении №1 данной инструкции по применению.

- При работе с Набором реагентов соблюдать следующие правила: использовать одноразовые нитриловые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.
- Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует утилизировать согласно правилам, принятым в организации.
- Набор реагентов готов к применению согласно инструкции по применению. Применять набор реагентов строго по назначению.
- Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации.
- К работе с Набором реагентов допускается только обученный персонал.
- Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать Набор реагентов по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

11. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки

Каждая зона ПЦР-лаборатории должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами (см. Приложение №1).

Замена амплификатора и пробирок для амплификации на оборудование и материалы с аналогичными характеристиками не допускается!

Перечень материалов и оборудования, необходимых для проведения исследования:

- ПЦР-бокс для приготовления реакционной смеси;
- ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР;
- Комплект дозаторов переменного объема и наконечников с фильтром, позволяющих отбирать объемы жидкостей от 2 до 1000 мкл;
- Амплификатор детектирующий: Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнение: C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (Производитель: Био-Рад Лабораториз, Инк, США);
- Пробирки для амплификации 0.2 мл (Кат. № SSI-3247-00, Производитель: SSI, США);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и 2.0 мл;
- Мини-центрифуга/вортекс;
- Термостат.

12. Биологический материал

ДНК, выделенная из периферической крови, буккального эпителия, слюны набором реагентов «ЭкстрактДНК-1» (кат.№ R1002) или «ЭкстрактДНК-2» (кат.№ R1003) производства ООО «НОМОТЕК».

Для анализа одного образца по одной мутации необходимо 10 мкл препарата ДНК. Не проводить определение генотипа по смеси ДНК, выделенной из разных образцов.

Хранить и транспортировать препарат ДНК при температуре от -28 до -10 °С в течение 1 месяца, с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

13. Протокол анализа образца

13.1 Подготовка компонентов. Приготовление реакционной смеси

1. В ПЦР-боксе для приготовления реакционных смесей разморозить при температуре от +15 до +30 °С компоненты: «ПЦР-смесь», «Вода деионизированная» и «Олиго-смесь» (одновременно все три или только некоторые из них в зависимости от анализируемых аллельных вариантов).

2. Содержимое пробирок тщательно перемешать четырехкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортексе в течение 10 с, не допуская образования пены; сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

3. Рассчитать необходимый объем компонентов для реакционной смеси, исходя из числа исследуемых образцов и согласно Таблице 4.

Дополнительно необходимо провести реакции с:

- ПКО-1, ПКО-2, ПКО-3;
- Контрольным образцом без ДНК.

Если при выделении ДНК были получены образцы ОКВ, то при постановке ПЦР включить их вместе с исследуемыми образцами, выделенными одновременно с ними.

Каждую реакцию с контрольными и исследуемыми образцами необходимо выполнить в двух повторностях.

Таблица 4 – расчет количества компонентов (контрольные образцы и выполнение всех образцов в двух повторностях учтены в формуле)

Для каждого аллельного варианта готовится реакционная смесь, в состав которой входит только одна из трех олиго-смесей

Компонент реакционной смеси	Количество компонента, мкл (где N – анализируемые образцы, X – ОКВ, 4 – ПКО-1,2,3 и КО без ДНК)
Вода деионизированная	$10.5 \times 2(N+X+4)$
ПЦР-смесь	$5.25 \times 2(N+X+4)$
Олиго-смесь	$5.25 \times 2(N+X+4)$

4. Приготовить реакционную смесь.

Менять наконечники между компонентами!

5. Тщательно перемешать реакционную смесь встряхиванием на вортексе в течение 10 с; сбросить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 5 с.

6. Подготовить пробирки для ПЦР (стрипы; 1 стрип – 8 пробирок): установить в штатив, промаркировать.

Не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. Маркировку наносить на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.

Перед внесением образцов в пробирки для ПЦР (п.7-13) ознакомиться со схемой расположения исследуемых образцов, ПКО, ОКВ и Контрольного образца без ДНК относительно друг друга.

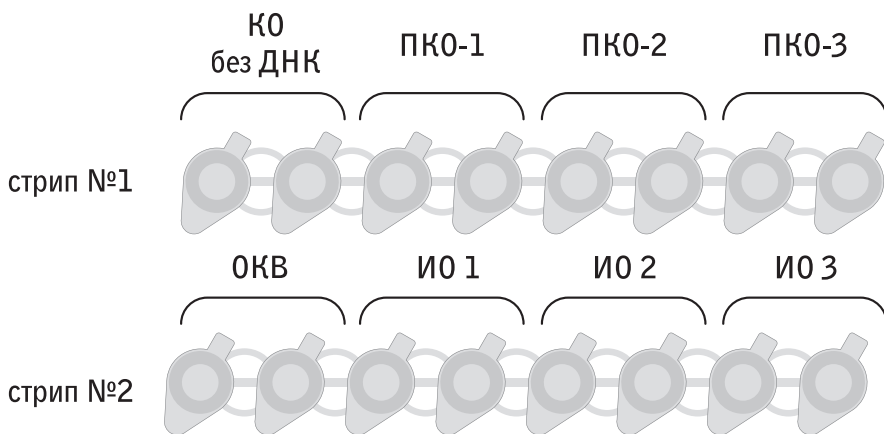


Рисунок 2 – схема расположения пробирок для ПЦР при исследовании 3 образцов. На рисунке изображена схема расположения пробирок для ПЦР при исследовании 3 образцов. При изменении количества исследуемых образцов сохранять расположение пробирок для ПЦР и порядок внесения (п. 7-13) исследуемых образцов, ПКО-1, ПКО-2, ПКО-3, ОКВ и Контрольного образца без ДНК относительно друг друга. ИО – исследуемый образец, ОКВ – отрицательный контроль выделения, КО без ДНК – контрольный образец без ДНК.

7. Внести по 20 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.

Менять наконечники между разными реакционными смесями!

8. Добавить по 5 мкл «Вода деионизированная», которая использовалась для приготовления реакционной смеси, в пробирки для ПЦР, соответствующие Контрольному образцу без ДНК. Плотно закрыть крышки пробирок.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

9. Закрыть крышки других пробирок для ПЦР. Перенести все пробирки для ПЦР в ПЦР-бокс для внесения ДНК.

13.2 Подготовка контрольных образцов и ДНК.

Внесение образцов в пробирки для ПЦР

10. В ПЦР-боксе для внесения ДНК разморозить при температуре от +15 до +30 °С ПКО-1,2,3.

Для анализа полиморфизма *CYP2C19*2* использовать: ПКО-1 *CYP2C19*2*, ПКО-2 *CYP2C19*2*, ПКО-3 *CYP2C19*2*.

Для анализа полиморфизма *CYP2C19*3* использовать: ПКО-1 *CYP2C19*3*, ПКО-2 *CYP2C19*3*, ПКО-3 *CYP2C19*3*.

Для анализа полиморфизма *CYP2C19*17* использовать: ПКО-1 *CYP2C19*17*, ПКО-2 *CYP2C19*17*, ПКО-3 *CYP2C19*17*.

11. Разморозить/прогреть при температуре +50 °С исследуемые образцы ДНК и ОКВ.

12. Все образцы перемешать встряхиванием на вортексе, сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

13. Добавить по 5 мкл ОКВ в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

14. Добавить по 5 мкл ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

15. Добавить по 5 мкл контрольных образцов ПКО-1,2,3 в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения контрольного образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

16. Проверить плотность закрытия крышек пробирок.

17. Перемешать встряхиванием содержимое пробирок для ПЦР, не допуская образования пены.

18. Сбросить капли центрифугированием в течение 10 с.

Проведение ПЦР

19. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

20. Запустить программное обеспечение амплификатора. Открыть созданный ранее шаблон или ввести параметры:

– программа амплификации (одинакова для каждого прибора)

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация	95	3 мин	–
Амплификация	95	10 с	–
50 циклов	60	30 с	FAM, HEX

- создать разметку плашки в соответствии с установленными пробирками в блок амплификатора;
- всем образцам, включая контрольные, задать «Sample Type» и тип «Unknown»;
- для всех образцов, включая контрольные, выбрать каналы детекции FAM и HEX;
- в поле «Target Name» ввести имя мишени (по названию используемой олиго-смеси) для каналов детекции FAM и HEX;
- в поле «Sample Name» ввести названия контрольных образцов:

Контрольный образец	Название контрольного образца в плашке ПЦР
Контрольный образец без ДНК	NTC
ОКВ	OKV Если образцов ОКВ несколько, то пронумеровать их (OKV-1, OKV-2 и т.д.).
ПК0-1 СУР2С19*2, ПК0-1 СУР2С19*3, ПК0-1 СУР2С19*17	PK0-1
ПК0-2 СУР2С19*2, ПК0-2 СУР2С19*3, ПК0-2 СУР2С19*17	PK0-2
ПК0-3 СУР2С19*2, ПК0-3 СУР2С19*3, ПК0-3 СУР2С19*17	PK0-3

- в поле «Sample Name» ввести названия исследуемых образцов. Не вводить одинаковые названия для разных образцов;
- запустить программу амплификации.

14. Анализ данных

Анализ данных ПЦР провести с помощью программного обеспечения «ПО ГенТест», кат. № W2000, производства ООО «НОМОТЕК».

15. Условия транспортирования, хранения и использования

15.1 Набор реагентов «ГенТест СУР2С19» разрешается транспортировать всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

15.2 Транспортирование набора реагентов «ГенТест СУР2С19» осуществляется в пенопластовых термоконтейнерах с хладоэлементами в течение 5 суток при температуре от -28 до +8 °С.

15.3 Хранение набора реагентов «ГенТест СУР2С19» до и после первого вскрытия осуществляется при температуре от -28 до -10 °С.

15.4 Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, использованию не подлежит.

16. Срок годности

Срок годности 12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортирования и хранения. Набор реагентов или полученные в ходе использования смеси растворов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

17. Критерии непригодности набора реагентов для применения

Не использовать «ГенТест СУР2С19», если применим хотя бы один критерий непригодности:

- при первом вскрытии обнаружено повреждение фасовочной тары компонентов;
- нет возможности плотно закрыть фасовочную тару компонентов или обнаружены протечки;
- неполная комплектность, в том числе в результате применения;
- внешний вид компонентов не соответствует описанию;
- нарушены условия хранения;
- истек срок годности;
- компоненты загрязнены ДНК человека;
- изготовитель сообщил об отзыве производственной серии, к которой относится данный набор реагентов (посредством объявления на сайте www.nomotech.ru или иным способом).

18. Гарантии изготовителя

Предприятие-изготовитель ООО «НОМОТЕК» при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования набора реагентов «ГенТест СУР2С19» гарантирует:

- соответствие набора реагентов требованиям ТУ 20.59.52.199-005-11248074-2018;
- гарантийный срок хранения в упаковке – 12 месяцев со дня изготовления.

По истечению срока годности набор реагентов и все его компоненты применению не подлежат.

19. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость

19.1 Контроль качества набора реагентов осуществляется ОТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 20.59.52.199-005-11248074-2018.

Предприятие-изготовитель проводит приемо-сдаточные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик, внешнего вида, комплектности, упаковки, маркировки, а также проводит контроль качества сырья и компонентов.

19.2 Метрологическая прослеживаемость компонентов набора ПК0-1 СУР2С19*2, ПК0-2 СУР2С19*2, ПК0-3 СУР2С19*2, ПК0-1 СУР2С19*3, ПК0-2 СУР2С19*3, ПК0-3 СУР2С19*3, ПК0-1 СУР2С19*17, ПК0-2 СУР2С19*17, ПК0-3 СУР2С19*17 обеспечена до контрольных образцов предприятия, верифицируемых секвенированием по методу Сэнгера.

20. Порядок подачи рекламаций

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться:

- ООО «НОМОТЕК» 117997 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к.16;
- md-support@nomotech.ru – техническая поддержка.

При подаче рекламации необходимо исключить низкое качество биоматериала, ошибку измерения, ошибку выполнения протокола, нарушение условий транспортирования и хранения. Если все указанные факторы исключены, необходимо обратиться в службу технической поддержки.

21. Утилизация

21.1 Наборы реагентов «ГенТест СУР2С19», пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

21.2 Уничтожение наборов реагентов «ГенТест СУР2С19» осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

Приложение №1

Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории и правила ее организации:

- Зонирование
- Направление потока материалов и персонала
- Размещение оборудования и уборочного инвентаря

Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории

- Однонаправленность потока персонала и материалов.
- Технологическая одежда должна быть строго индивидуальна.
- Всегда использовать перчатки. Не прикасаться к поверхностям, оборудованию, ручкам дверей, холодильников и т.д. без перчаток.
- Не перемещать при работе, уборке помещений оборудование даже в пределах одной зоны.
- Не выходить за пределы зоны в технологической одежде.
- Маркировать используемые реактивы.
- Хранить используемые реактивы (вскрытые наборы реагентов) отдельно от не использовавшихся.
- Хранить материалы, содержащие ДНК отдельно от реактивов, использующихся для приготовления реакционной смеси.
- Выделение ДНК, приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
- При работе с дозаторами использовать наконечники с фильтром. Для каждой операции менять наконечник.
- Для хранения дозаторов использовать специальную стойку.
- После перемещения пробирок всегда осажать капли со стенок на мини-центрифуге. Избегать касания внутренней поверхности пробирок и крышек наконечником.
- Перед и после работы проверить исправность оборудования, убрать рабочее место. Для уборки ПЦР-бокса в т.ч. использовать ультрафиолет.
- После работы утилизировать использованные материалы – наконечники, пробирки и т.д. согласно регламенту лаборатории.
- Пробирки с ПЦР-продуктом не открывать в зоне №4. Для утилизации пробирок с ПЦР-продуктом в зоне №4 поместить пробирки в пакет, пакет закрыть, утилизировать.

Зонирование.

ПЦР-лаборатория для ПЦР-РВ должна включать минимальный набор рабочих зон:

- Зона №1 – для работы с геномной ДНК (выделение ДНК, подготовка образцов)
- Зона №2 – для приготовления реакционных смесей (изолирована от источника ДНК)
- Зона №3 – для внесения ДНК в реакционную смесь
- Зона №4 – для проведения ПЦР (место нахождения амплификаторов)

При необходимости возможно размещение зон №2 и №3 в одном помещении при соблюдении разделения процессов приготовления реакционных смесей и внесения ДНК в разных ПЦР-боксах.

Для работы с большим потоком биологического материала следует создать дополнительную зону № 1а для его приемки, регистрации, разбора, первичной обработки.

Для работы с ПЦР-продуктом необходимо создать дополнительную зону №5 – для манипуляций с ПЦР-продуктом (электрофорез, подготовка образцов перед секвенированием).

Перед каждой зоной должен быть оборудован санпропускник – для смены одежды на технологическую, хранения уборочного инвентаря.

Направление потока материалов и персонала.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока материалов. В зону №2 не должны попадать материалы из других зон. Для других зон действует принцип: материалы, побывавшие в зонах с большим номером, не должны перемещаться в обратном направлении. Под материалами следует понимать: пробирки, штативы, пакеты, документы и т.п.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока персонала, в т.ч. обслуживающего персонала. Люди, побывавшие в зонах с большим номером, могут перемещаться в обратном направлении только при соблюдении порядка подготовки персонала к работе (мытьё рук, смена комплекта одежды и т.д.). При работе в зоне №5 следует планировать рабочий процесс так, чтобы в этот день не возвращаться в другие зоны. Все находящиеся в лаборатории должны в каждой зоне менять одежду на технологическую: обувь, халат, шапочка, маска, перчатки, нарукавники. Технологическая одежда строго не должна перемещаться между зонами.

Размещение оборудования и уборочного инвентаря.

Каждая зона должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами. Минимальный список стационарного оборудования в зонах ПЦР-лаборатории:

- Зона №1а – центрифуга, штативы, вортекс, комплект дозаторов, комплект инструментов для работы с материалом, место для хранения материала;
- Зона №1 – ПЦР-бокс для выделения ДНК, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, термостат, штативы, морозильная камера, холодильная камера;
- Зона №2 – ПЦР-бокс для подготовки реакционной смеси, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона №3 – ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, термостат, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона №4 – амплификатор, центрифуга с ротором для стрипов и плашек;
- Зона №5 – ПЦР-бокс для работы с ПЦР-продуктом, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, штативы, прибор для проведения электрофореза, лабораторные весы, микроволновая печь, морозильная камера, холодильная камера.

Каждая зона должна быть снабжена индивидуальным уборочным инвентарем – ведро для мытья пола, швабра, тряпка для мытья пола, емкость и тряпки для мытья рабочих поверхностей, дезинфицирующие хлор- или перекись-содержащие средства. Уборочный инвентарь не должен перемещаться из одной зоны в другую.

Графические символы

	Номер по каталогу
	Код серии
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Использовать для приготовления реакционной смеси
	Только для научно-исследовательских целей
	Знак Общего количества тестов, которые могут быть выполнены с использованием реагентов, содержащихся в наборе
	Осторожно. Вредные для здоровья аллергические (раздражающие) вещества

Техническая поддержка: md-support@nomotech.ru

Изготовитель:

Общество с ограниченной ответственностью
«Новые Молекулярные Технологии» (ООО «НОМОТЕК»)

Фирменное наименование:

 **НОМОТЕК**

г. Москва, 119421

Ленинский проспект, д.111, корп.1, пом. 34, эт. 3

Тел.: +7 (968) 333 43 85

www.nomotech.ru

I0003