



Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2010/08633

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

ФармакоГенетика Варфарин

Информация о комплекте

Назначение:

Комплект реагентов ФармакоГенетика Варфарин предназначен для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом варфарина. Полученные результаты могут быть использованы при подборе оптимальной дозы варфарина.

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 набора:

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 учета пробоподготовки):

от 2 часов.

Количество определений:

48

Состав комплекта

Реактив	Количество	
Смеси для амплификации:		
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
ПЦР-буфер	960 мкл	2 пробирки
Taq-АТ-полимераза	96 мкл	1 пробирка
Минеральное масло	3,84 мл	1 флакон

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
CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys)	C	T	-	BK	-
CYP2C9: A>C (Ile359Leu)	A	C	-	BK	-
CYP4F2: C>T (Val433Met)	C	T	-	BK	-
VKORC1: -1639 G>A	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 $C_p \leq 32,0$ на канале детекции BK (Cy5). При использовании меньшего количества ДНК ($C_p > 32,0$) производитель не гарантирует корректную работу набора.

- 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 20 пробирок для исследуемых образцов и 4 пробирки для «К-». Общее количество пробирок – 24.

	CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys)	CYP2C9: A>C (Ile359Leu)	CYP4F2: C>T (Val433Met)	VKORC1: -1639 G>A
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 – 24. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы для 25 (24+1) пробирок, т.е. 250 мкл ПЦР-буфера + 12,5 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.

Изучите полную инструкцию перед началом работы

- 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 по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (4 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 «Warfarine.ini». Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тесты «СУР2С9: 430_С>Т», «СУР2С9: А>С», «СУР4F2: С>Т» и «VKORC1: _-1639_G>А» 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 учёт 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, Ср>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-АТ-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 метаболизмом варфарина, методом ПЦР в режиме реального времени (ФармакоГенетика Варфарин), 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
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
VKORC1: -1639 G>A	GG	54,0	48,0	AA	40,5	54,7	GA	53,0	54,3