



117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
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 2010/08413

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена веществ, методом полимеразной цепной реакции

Генетика Метаболизма

Формы комплектации:

Генетика Метаболизма Фолатов

Генетика Метаболизма Лактозы

Генетика Метаболизма Кальция

Информация о наборе

Назначение:

Набор реагентов Генетика Метаболизма предназначен для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена веществ, что позволяет оценить степень генетической предрасположенности к развитию заболеваний, связанных с метаболическими расстройствами.

Набор выпускается в следующих формах комплектации:

- Комплект реагентов Генетика Метаболизма Фолатов, предназначенный для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла;
- Комплект реагентов Генетика Метаболизма Лактозы, предназначенный для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена лактозы;
- Комплект реагентов Генетика Метаболизма Кальция, предназначенный для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена кальция, методом ПЦР в режиме реального времени.

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 производства ООО «НПО ДНК-Технология»; версия программного обеспечения не ниже 7.3.5.57, рекомендуемая версия 7.7.5.30³

Внимание! Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании «ДНК-Технология».

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):

от 2 часов.

Количество определений:

48

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

Состав набора

Реактив	Количество	
Комплект Генетика Метаболизма Фолатов		
• Смеси для амплификации:		
1. MTHFR: 677 C>T (Ala222Val)	960 мкл	1 пробирка
2. MTHFR: 1298 A>C (Glu429Ala)	960 мкл	1 пробирка
3. MTR: 2756 A>G (Asp919Gly)	960 мкл	1 пробирка
4. MTRR: 66 A>G (Ile22Met)	960 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	960 мкл	2 пробирки
• Таq-АТ-полимераза	96 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	3,84 мл	1 флакон
Комплект Генетика Метаболизма Лактозы		
• Смеси для амплификации:		
1. MCM6: -13910 T>C	960 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	480 мкл	1 пробирка
• Таq-АТ-полимераза	24 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	960 мкл	1 пробирка
Комплект Генетика Метаболизма Кальция		
• Смеси для амплификации:		
1. VDR: 283 A>G (BsmI)	960 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	480 мкл	1 пробирка
• Таq-АТ-полимераза	24 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	960 мкл	1 пробирка

Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля

Название смеси для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Комплект Генетика Метаболизма Фолатов					
MTHFR: 677 C>T (Ala222Val)	C	T	-	BK	-
MTHFR: 1298 A>C (Glu429Ala)	A	C	-	BK	-
MTR: 2756 A>G (Asp919Gly)	A	G	-	BK	-
MTRR: 66 A>G (Ile22Met)	A	G	-	BK	-
Комплект Генетика Метаболизма Лактозы					
MCM6: -13910 T>C	C	T	-	BK	-
Комплект Генетика Метаболизма Кальция					
VDR: 283 A>G (BsmI)	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 набора.

- 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-») (таблица 1).
- 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 Таq-АТ-полимеразой в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

Внимание! Таq-АТ-полимеразу необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

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

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

где N — количество промаркированных пробирок с учётом «К-» (таблица 1).

Пример маркировки пробирок и приготовления смеси ПЦР-буфера с Taq-AT-полимеразой для исследования **5** образцов

Название комплекта	Количество промаркированных пробирок	Количество ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы
Генетика Метаболизма Фолатов	4 полиморфизма, 20 пробирок для исследуемых образцов и 4 пробирки для «К-», всего 24 пробирки.	Промаркированных пробирок – 24. Смесь ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы для 25 (24+1) пробирок, т.е. 250 мкл ПЦР-буфера + 12,5 мкл Taq-AT-полимеразы.
Генетика Метаболизма Лактозы	1 полиморфизм, 5 пробирок для исследуемых образцов и 1 пробирка для «К-», всего 6 пробирок.	Промаркированных пробирок – 6. Смесь ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы для 7 (6+1) пробирок, т.е. 70 мкл ПЦР-буфера + 3,5 мкл Taq-AT-полимеразы.
Генетика Метаболизма Кальция		

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 пп. 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.

1.10 Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.

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

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

1.13 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора.

1.14 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл с соответствующим названием (Folates.ini, Lactose.ini, Calcium.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. 1.13) 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.

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 пробирку, $Cp > 32,0$ на канале детекции ВК) программа определяет недостоверный результат («нд»).

Условия хранения

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

Taq-AT-полимераза следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности. Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена веществ, методом полимеразной цепной реакции (Генетика Метаболизма), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, корп.6, тел./факс +7 (495) 980-45-55, 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/.

Генотипы и температуры плавления аллельных вариантов
(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
Комплект Генетика Метаболизма Фолатов									
MTHFR: 677 C>T (Ala222Val)	CC	56,3	46,0	TT	47,0	54,4	CT	54,8	54,3
MTHFR: 1298 A>C (Glu429Ala)	AA	55,9	48,5	CC	45,5	57,8	AC	55,2	56,7
MTR: 2756 A>G (Asp919Gly)	AA	54,1	46,3	GG	46,0	53,0	AG	54,1	52,2
MTRR: 66 A>G (Ile22Met)	AA	51,8	41,0	GG	47,2	52,8	AG	51,9	52,2
Комплект Генетика Метаболизма Лактозы									
MCM6: -13910 T>C	CC	56,7	47,0	TT	48,6	56,7	CT	56,4	55,6
Комплект Генетика Метаболизма Кальция									
VDR: 283 A>G (BsmI)	GG	53,5	41,8	AA	46,2	51,4	AG	53,3	51,1