

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с функциями интерлейкина 28В, методом ПЦР в режиме реального времени,**ИммуноГенетика IL28В****Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с функциями интерлейкина 28В, методом ПЦР в режиме реального времени,****ИммуноГенетика IL28В****Информация о наборе****Назначение:**

Набор реагентов ИммуноГенетика IL28В предназначен для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с функциями интерлейкина 28В. Полученные результаты могут быть использованы при назначении комбинированной противовирусной терапии при вирусном гепатите С.

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 (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 (для ДТ322 функция контроля количества ДНК в каждой пробирке не поддерживается); версия программного обеспечения не ниже 7.3.5.57, рекомендуемая версия 7.5.5.23³

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

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/>

Состав набора

Реактив	Количество
Комплект ИммуноГенетика IL28B	
<ul style="list-style-type: none"> • Смеси для амплификации 1. IL28B: rs12979860 C>T 2. IL28B: rs8099917 T>G • ПЦР-буфер • Таq-АТ-полимераза • Минеральное масло 	<ul style="list-style-type: none"> 960 мкл 1 пробирка 960 мкл 1 пробирка 480 мкл 2 пробирки 48 мкл 1 пробирка 960 мкл 2 пробирки

Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля

Название смеси для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
IL28B: rs12979860 C>T	C	T	-	-	-
IL28B: rs8099917 T>G	T	G	-	BK	-

Инструкция по применению

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 объёмом 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.

	IL28B: rs12979860 C>T	IL28B: rs8099917 T>G
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 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-».

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

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

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

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

- 1.8. 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 аэрозольным барьером.
- Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (2 шт. для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки «К-» ДНК не вносится.
- 1.9. Внесите в пробирки, маркированные «К-», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.
- 1.10. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
- 1.11. Установите все пробирки в блок амплификатора детектирующего.
- 1.12. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл «IL28B.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тесты «IL28B: rs12979860_C>T», «IL28B: rs8099917_T>G» 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. п. 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 амплификаторов детектирующих.

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

Внимание! Если при определении полиморфизма IL28B: rs8099917 T>G для образца получены недостоверные результаты, то результаты определения полиморфизма IL28B: rs12979860 C>T для этого образца также являются недостоверными и не должны учитываться.

Условия хранения и эксплуатации

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

Taq-AT полимеразу 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 функциями интерлейкина 28В, методом полимеразной цепной реакции (ИммуноГенетика IL28В), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.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/

Приложение

Таблица 1.

Генотипы и температуры плавления аллельных вариантов
(только для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96)

Полиморфизм	Гомозигота Fam/Fam			Гомозигота Hex/Hex			Гетерозигота Fam/Hex		
	Генотип	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C	Генотип	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C	Генотип	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C
IL28B: rs12979860 C>T	CC	60,5	46,8	TT	52,3	57,7	CT	60,3	57,5
IL28B: rs8099917 T>G	TT	52,4	41,8	GG	44,0	55,1	TG	51,8	54,5

ДНК-Технология

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