

143-15 2024-07-03



ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплектов реагентов
для определения генетических полиморфизмов
методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2010/08633 от 01 июля 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	НАЗНАЧЕНИЕ	3
2	ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТОВ.....	3
2.1	Принцип действия.....	3
2.2	Состав комплектов	4
2.3	Время проведения анализа	5
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
3.1	Специфичность анализа	5
3.2	Чувствительность анализа	5
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	6
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	8
6.1	Взятие цельной периферической крови	8
6.2	Транспортирование и хранение исследуемого материала	8
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	8
7.1	Выделение ДНК из биологического материала.....	8
7.2	Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции	9
7.3	Загрузка теста для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере	12
7.4	Многотестовый режим	14
7.5	Ежедневная работа с тестом	14
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ.....	20
9	УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.....	22
10	УЛУЧШЕНИЕ ВИЗУАЛИЗАЦИИ	25
11	ОШИБКИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПЦР	28
12	УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ КОМПЛЕКТОВ	32
13	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	33
14	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	34
	Приложение А	35

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Комплекты реагентов для определения генетических полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени предназначены для определения генетических полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в препаратах ДНК человека, полученных из периферической крови.
- 1.2** Комплекты реагентов могут быть использованы в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТОВ

2.1 Принцип действия

Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В смесь для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex, на каждый вариант определяемого генетического полиморфизма. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура плавления такого дуплекса будет ниже температуры плавления дуплекса в случае полной комплементарности зонда. На основании температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

В состав смесей для амплификации, специфичных для каждого генетического полиморфизма, включена система для амплификации фрагмента геномной ДНК человека, которая позволяет контролировать количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

Система для амплификации геномной ДНК человека включает ДНК-зонд, который содержит флуоресцентную метку (Cy5) и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Комплекты реагентов для определения генетических полиморфизмов включают смеси для амплификации, специфичные для каждого генетического полиморфизма.

Использование трёх флуоресцентных красителей позволяет одновременно определять два аллеля и оценивать количество геномной ДНК в одной пробирке.

Исследование с использованием комплектов реагентов для определения генетических полиморфизмов состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация в режиме реального времени.

2.2

Состав комплектов

Каждый комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени включает смесь для амплификации, ПЦР-буфер, Taq-АТ-полимеразу и минеральное масло.

Смесь для амплификации специфична для каждого генетического полиморфизма.

ПЦР-буфер, Taq-АТ-полимераза, минеральное масло – универсальные реагенты для всех комплектов реагентов для определения генетических полиморфизмов.

Количество реагентов на 48 определений одного генетического полиморфизма:

- смесь для амплификации – 960 мкл;
- ПЦР-буфер – 480 мкл;
- Taq-АТ-полимераза – 24 мкл;
- минеральное масло – 960 мкл.

Примечание – В комплектах реагентов для определения нескольких генетических полиморфизмов количество реагентов увеличивается пропорционально количеству определяемых полиморфизмов.

Каждый комплект реагентов комплектуется инструкцией и паспортом. В инструкции указаны: состав данного комплекта, каналы детекции аллельных вариантов, критерии анализа включённых в комплект генетических полиморфизмов.

- 2.3** Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки) – от 2 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации программное обеспечение для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 проводит анализ количества ДНК человека и при достаточном для исследования количестве (не менее 1,0 нг на пробирку) определяет генотип исследуемого образца.

3.2 Чувствительность анализа

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует $C_p \leq 32,0$ на канале детекции ВК (Cy5). При использовании меньшего количества ДНК ($C_p > 32,0$ на канале детекции ВК) производитель не гарантирует корректную работу набора.

В образцах с недостаточным количеством (менее 1,0 нг на амплификационную пробирку) ДНК после завершения реакции амплификации регистрируется недостоверный результат (нд).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» и санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

Утилизировать неиспользованные реактивы, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологический материал необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения исследования с использованием комплектов реагентов для определения генетических полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»));
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой;
- морозильник бытовой;

¹ – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2

² – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6

- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки объёмом 0,2 мл для амплификации;
- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы электронные с адаптером и/или дозаторы механические переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от ДНКа¹ и РНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- Версия ПО не ниже 7.3.5.57¹;
- ini файл с параметрами анализа.

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

¹ – 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/>

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала.

6.1 Взятие цельной периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА. Комплект ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА рекомендуется использовать в случае, если предполагается длительное хранение выделенной ДНК (до 6 месяцев). ДНК, полученную с использованием комплекта ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, следует хранить не более одного месяца. Полученный препарат ДНК можно использовать для постановки примерно 50 реакций для определения генетических полиморфизмов.

Полученную ДНК также можно использовать для HLA-генотипирования.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объеме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1 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-»).

Например, необходимо проанализировать 5 образцов по 9 полиморфизмам. Для каждого полиморфизма нужно промаркировать 6 пробирок – пять для исследуемых образцов и одну для «К-». Общее количество пробирок для всех полиморфизмов – 54.

7.2.2 Встряхните пробирки со смесью для амплификации в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждого полиморфизма отдельным наконечником).

7.2.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-АТ-полимеразой в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Taq-АТ-полимеразу необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-АТ-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
 - 0,5 x (N+1) мкл Taq-АТ-полимеразы,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К-».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов и один «К-» по 9 полиморфизмам. Промаркированных пробирок – 54. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы для 55 (54+1) пробирок, т.е. 550 мкл ПЦР-буфера + 27,5 мкл Taq-АТ-полимеразы.

7.2.6 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.2.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Taq-АТ-полимеразой.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 7.2.8 – 7.2.13.

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

7.2.9 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.

7.2.10 Внесите в пробирки, маркированные «К-», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (7.1).

7.2.11 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

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

7.2.13 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, выберите режим «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл с соответствующим названием (7.3). Далее и при последующих постановках добавляйте в протокол тесты (7.5) или используйте многотестовый режим (7.4), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (7.5.7) и проведите ПЦР. При выборе теста в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 1.

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

Таблица 1 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt, °C	Тип блока
1	80	2	00	1			Цикл
	94	5	00				
2	94	0	30	5	√		Цикл
	67	0	15				
3	94	0	05	45	√		Цикл
	67	0	15				
4	25	0	30	1			Цикл
5	25	0	15	50	√	1,0 °C	«Кривая плавления», Δt=1 °C; T _{кон} =75 °C
6	10 ¹	...	...	Хранение			Хранение

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании «ДНК-Технология».

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

7.3 Загрузка теста для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере

Версия ПО не ниже 7.3.5.57¹.

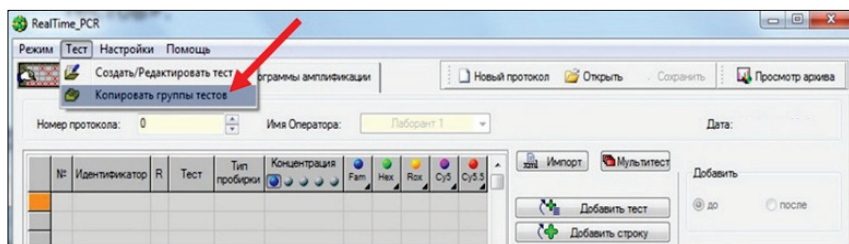
Примечание – Для иллюстраций в настоящей инструкции использованы скриншоты версий 7.3.6.42, 7.7.5.44 и 7.9.5.15.

Тесты (ini файлы) для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляются производителем набора. Их установку в программу Real Time_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

- 7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для определения генетических полиморфизмов, выберите режим «Работа с прибором».

При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

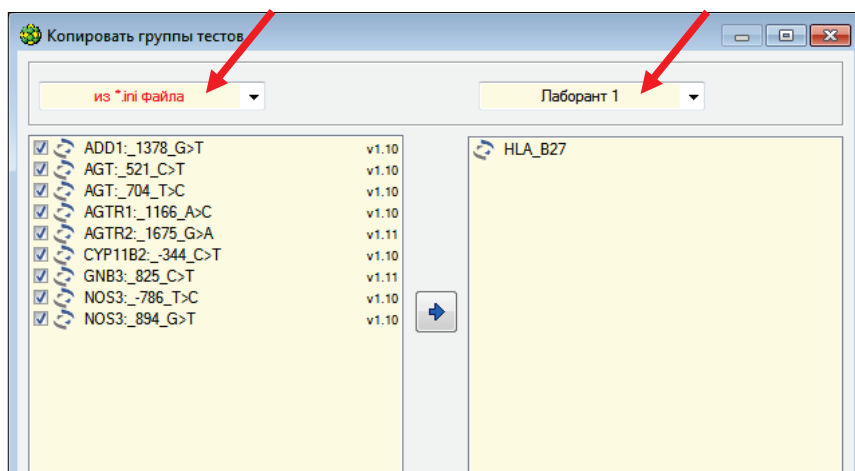
- 7.3.2 В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».



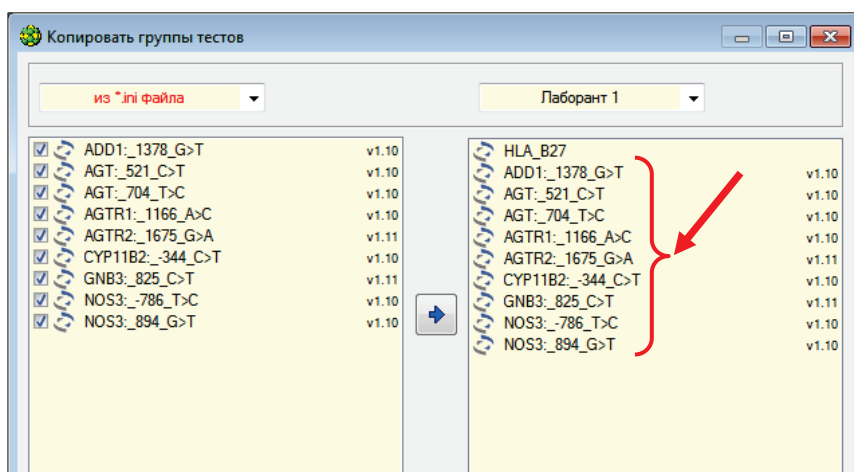
- 7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл.

¹ – 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/>

- 7.3.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тесты.



- 7.3.5 Выберите тесты для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранные тесты появятся в правой половине окна.



Теперь с тестами может работать оператор, для которого были скопированы тесты.

7.4 Многотестовый режим

Отдельные тесты после загрузки могут быть объединены в группу. В этом случае образец будет автоматически анализироваться по всем тестам, входящим в группу.

Для создания группы тестов необходимо:

- перейти в пункт меню «Тест» -> «Создать/Редактировать тест»;
- в открывшемся окне нажать кнопку «Создать новый тест»;
- ввести в пустое поле название новой группы тестов;
- отметить галочкой «многотестовый режим»;
- нажать кнопку «ОК».

Откроется окно «Тест».

В правой половине окна отметьте галочками тесты, которые необходимо объединить в группу. Расположите тесты в последовательности, соответствующей последовательности полиморфизмов, указанной в инструкции к соответствующему набору реагентов. Выбранные тесты появятся в левой половине окна. Нажмите кнопку «ОК».

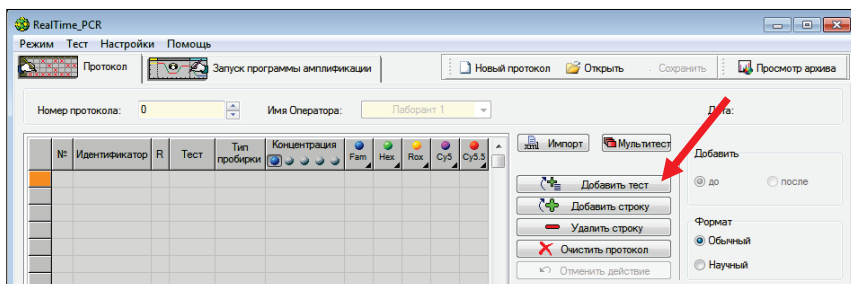
Тесты будут объединены в группу.

ВНИМАНИЕ! При использовании многотестового режима, во время установки пробирок в термоблок, необходимо точно следовать последовательности тестов в группе. При неправильной установке пробирок возможно получение ошибочных результатов анализа.

7.5 Ежедневная работа с тестом

7.5.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тесты (см. 7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

7.5.2 Нажмите кнопку «Добавить тест».



7.5.3 Выберите из списка тест или группу тестов.

Добавить тест

Тест: ADD1:_1378_G>T v1.10

Описание:

Тип анализа: Все тесты

1. Образцы: **Ср** ADD1:_1378_G>T v1.10
 AGT:_521_C>T v1.10
 AGT:_704_T>C v1.10
 AGTR1:_1166_A>C v1.10
 AGTR2:_1675_G>A v1.11
 CYP11B2:_344_C>T v1.10
 GNB3:_825_C>T v1.11
 HLA_B27

Количество: 1 Дубли: 1

2. Стандарты: ☐ Значения стандартов из другого протокола

Количество: 0 Дубли: 2

3. Контроли: Положительные (К+): 0
 Отрицательные (К-): 0

Подробнее Добавить Ok Отмена

Для многотестового режима:

Добавить тест

Тест: ADD1:_1378_G>T v1.10

Описание: AGTR1:_1166_A>C v1.10
AGTR2:_1675_G>A v1.11
CYP11B2:_344_C>T v1.10
GNB3:_825_C>T v1.11
HLA_B27
Hypertension
NOS3:_786_T>C v1.10
NOS3:_894_G>T v1.10

Тип анализа: Все тесты

1. Образцы: Количество: 1 Дубли: 1

2. Стандарты: ☐ Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 2

3. Контроли: Положительные (К+): 0
Отрицательные (К-): 0

Детально Добавить Ок Отмена

- 7.5.4 Укажите количество исследуемых образцов (отрицательные контрольные образцы следует указывать как образцы), нажмите кнопку «Ок».

Добавить тест

Тест: Hypertension Все тесты

Описание:

Тип анализа: Анализ полиморфизмов / плавление

1. Образцы: Количество: 1 (x9) Дубли: 1

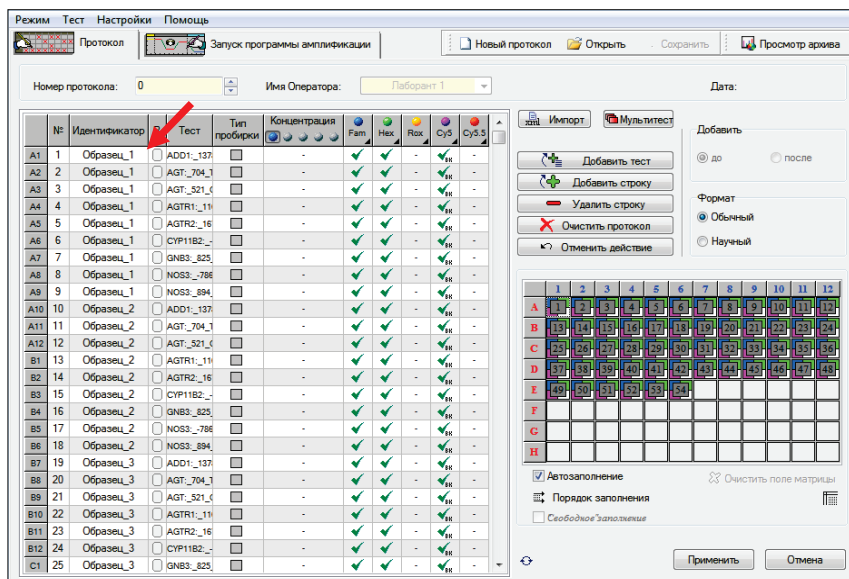
2. Стандарты: ☐ Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 1

3. Контроли: Положительные (K+): 0
Отрицательные (K-): 0

Податочно Добавить Ок Отмена

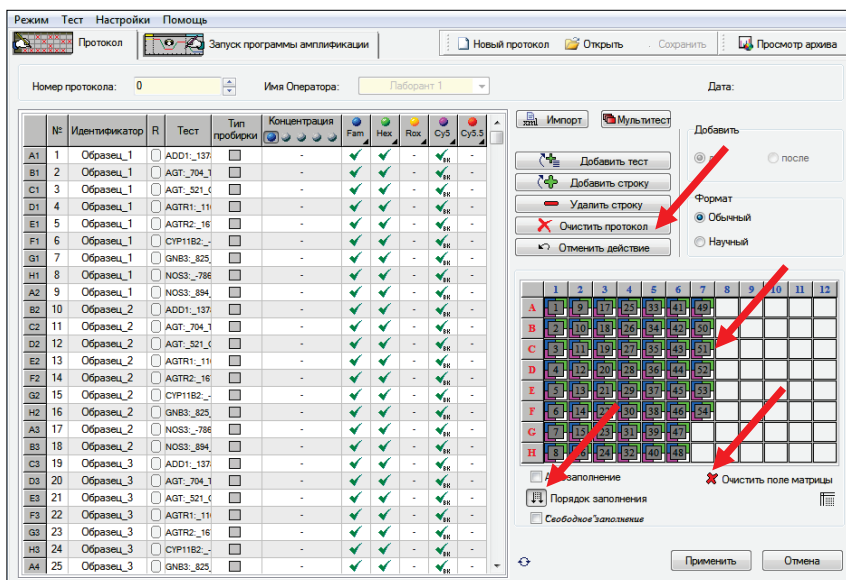
- 7.5.5 При использовании нескольких тестов в одном протоколе повторите пункты 7.5.2 – 7.5.4.

7.5.6 Укажите идентификаторы пробирок.



7.5.7 Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при ошибочном заполнении нажмите кнопки

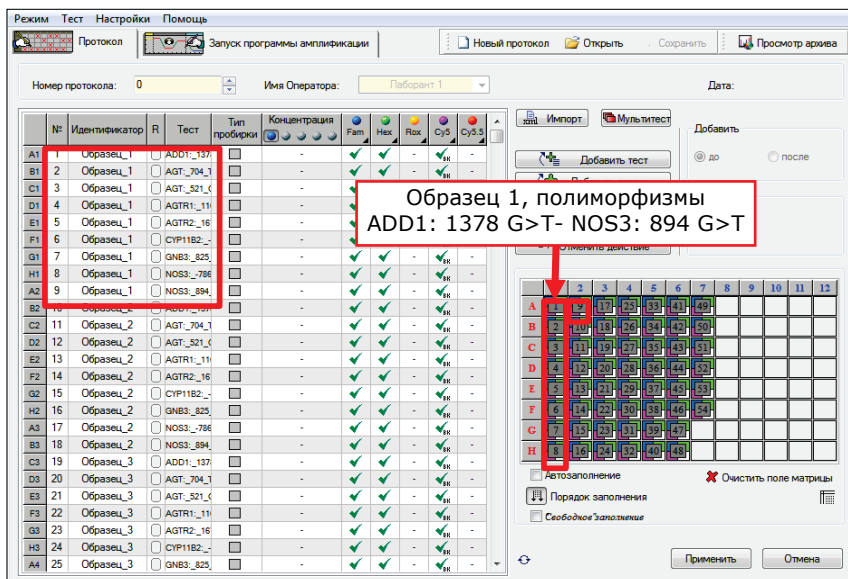
«Очистить поле матрицы» - или
 «Очистить протокол» - и
 «Порядок заполнения» -).



Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.

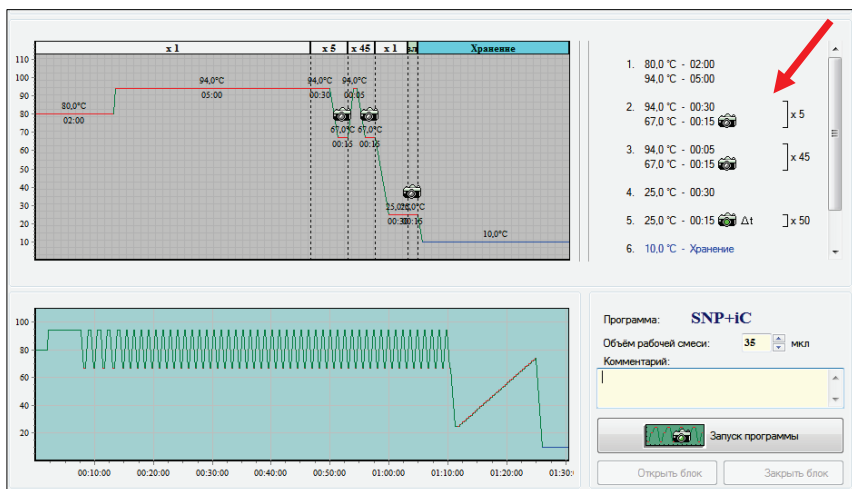
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1	7	13	19	25	31	37	43	49		
C		2	8	14	20	26	32	38	44	50		
D		3	9	15	21	27	33	39	45	51		
E		4	10	16	22	28	34	40	46	52		
F		5	11	17	23	29	35	41	47	53		
G		6	12	18	24	30	36	42	48	54		
H												

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.



7.5.8 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

7.5.9 В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «SNP+IC».



7.5.10 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

7.5.11 Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см. 7.3.1).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время выполнения программы амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляется детектирующим амплификатором автоматически.

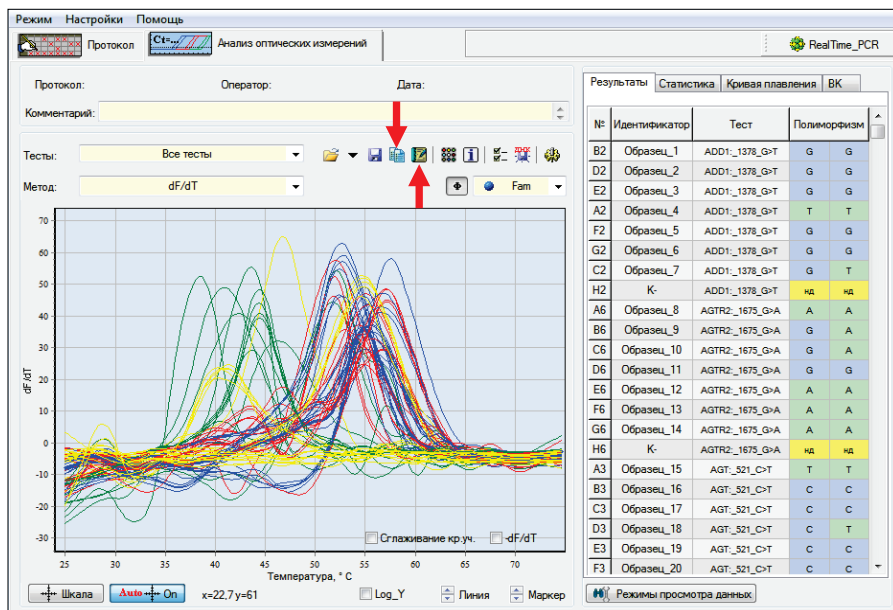
После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

В таблице справа будет показан идентификатор образца, название теста, результат для каждого образца (генотип). На графике будет отображена зависимость флуоресценции от температуры плавления для каждой пробирки в термоблоке.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

Для создания лабораторного отчета необходимо нажать кнопку «Отчет»  .

Для получения бланка ответа необходимо нажать кнопку «Бланк ответа»  .



Определение генетического полиморфизма

Дата
Номер пробирки
Ф.И.О. пациента
Пол
Возраст
Организация
Врач
Примечание

Логотип

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_10

№	Наименование исследования	Результаты
		Генотип
1	AGTR2_1675_G>A	G A

Исследование выполнил

Дата:
Подпись:

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

Для всех образцов программа фиксирует результат амплификации геномной ДНК человека (ВК). Для корректной работы комплекта реагентов количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует $C_p \leq 32,0$.

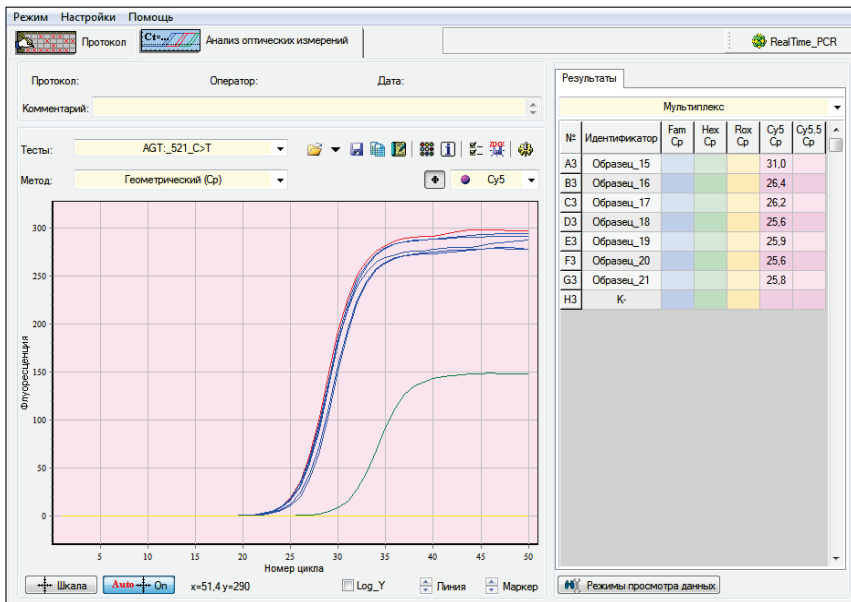
Примечание – В графе «ВК» указывается округленное значение C_p .

Результаты			
Статистика			
Кривая плавления			
ВК			
№	Идентификатор	Тест	Ср
B2	Образец_1	ADD1_1378_G>T	26,0
D2	Образец_2	ADD1_1378_G>T	26,0
E2	Образец_3	ADD1_1378_G>T	26,0
A2	Образец_4	ADD1_1378_G>T	30,5
F2	Образец_5	ADD1_1378_G>T	26,0
G2	Образец_6	ADD1_1378_G>T	25,5
C2	Образец_7	ADD1_1378_G>T	26,0
H2	К-	ADD1_1378_G>T	-
A6	Образец_8	AGTR2_1675_G>A	31,0
B6	Образец_9	AGTR2_1675_G>A	26,5
C6	Образец_10	AGTR2_1675_G>A	26,0
D6	Образец_11	AGTR2_1675_G>A	25,5
E6	Образец_12	AGTR2_1675_G>A	25,5
F6	Образец_13	AGTR2_1675_G>A	25,5
G6	Образец_14	AGTR2_1675_G>A	25,5
H6	К-	AGTR2_1675_G>A	-
A3	Образец_15	AGT_521_C>T	31,0
B3	Образец_16	AGT_521_C>T	26,5
C3	Образец_17	AGT_521_C>T	26,0
D3	Образец_18	AGT_521_C>T	25,5
E3	Образец_19	AGT_521_C>T	26,0
F3	Образец_20	AGT_521_C>T	25,5

Режимы просмотра данных

Графическое отображение зависимости флуоресценции от номера цикла можно увидеть, выбрав тип анализа «Мультиплекс», метод «Геометрический (C_p)» и канал детекции Cy5.

По каналу Cy5 в таблице будут показаны исходные (не округленные) значения C_T для ВК.



9.2 В образцах, прошедших ПЦР, и содержащих достаточное для корректного анализа количество ДНК, программа определяет генотип исследуемого образца, который отображён в таблице в графе «Полиморфизм».

Результаты				
Статистика Кривая плавления ВК				
№	Идентификатор	Тест	Полиморфизм	
B2	Образец_1	ADD1_1378_G>T	G	G
D2	Образец_2	ADD1_1378_G>T	G	G
E2	Образец_3	ADD1_1378_G>T	G	G
A2	Образец_4	ADD1_1378_G>T	T	T
F2	Образец_5	ADD1_1378_G>T	G	G
G2	Образец_6	ADD1_1378_G>T	G	G
C2	Образец_7	ADD1_1378_G>T	G	T
H2	K	ADD1_1378_G>T	нд	нд
A6	Образец_8	AGTR2_1675_G>A	A	A
B6	Образец_9	AGTR2_1675_G>A	G	A
C6	Образец_10	AGTR2_1675_G>A	G	A
D6	Образец_11	AGTR2_1675_G>A	G	G
E6	Образец_12	AGTR2_1675_G>A	A	A
F6	Образец_13	AGTR2_1675_G>A	A	A
G6	Образец_14	AGTR2_1675_G>A	A	A
H6	K	AGTR2_1675_G>A	нд	нд
A3	Образец_15	AGT_521_C>T	T	T
B3	Образец_16	AGT_521_C>T	C	C
C3	Образец_17	AGT_521_C>T	C	C
D3	Образец_18	AGT_521_C>T	C	T
E3	Образец_19	AGT_521_C>T	C	C
F3	Образец_20	AGT_521_C>T	C	C

9.3 Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК (менее 1,0 нг на пробирку, $C_p > 32,0$ на канале детекции ВК), программа определяет недостоверный результат («нд»).

В этих случаях требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

9.4 Для образцов с достаточным для анализа количеством ДНК ($C_p \leq 32,0$) программа может определять сомнительный результат («?») согласно следующим параметрам анализа полиморфизмов:

- «Анализ по температурным пикам» - температура плавления продуктов ПЦР отличается от заданной более, чем на 3,0 °C;

- «Разностный анализ» - разница между заданной и полученной температурами плавления по каналам Fam и Hex в пределах одного генотипа составляет более 1,5 °C;
- «Нижний порог температурного пика» - температурный пик (dF/dT) < 5,0.

Для таких образцов требуется повторное проведение ПЦР.

9.5 Для отрицательных контрольных образцов программа фиксирует недостоверный результат. При получении положительного значения (определение генотипа) результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 УЛУЧШЕНИЕ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

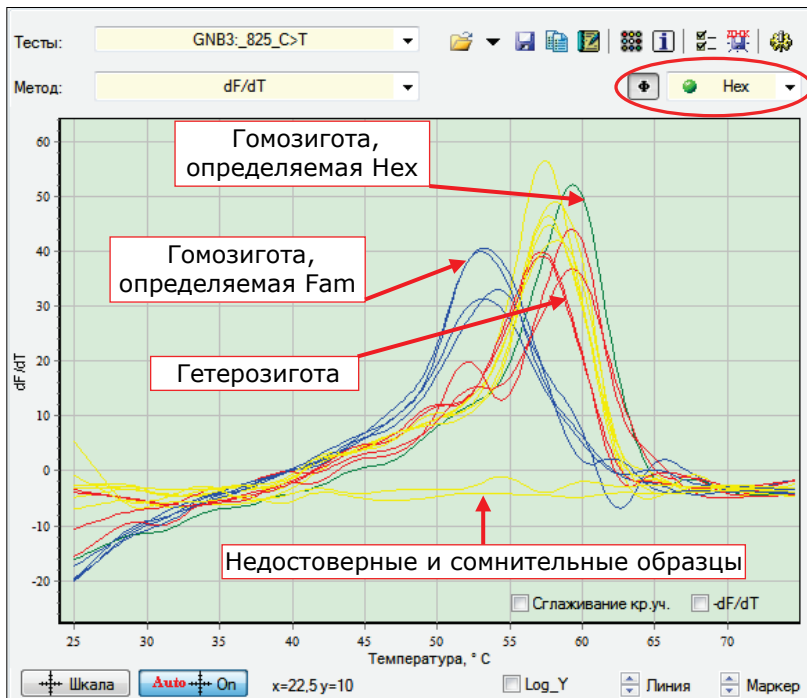
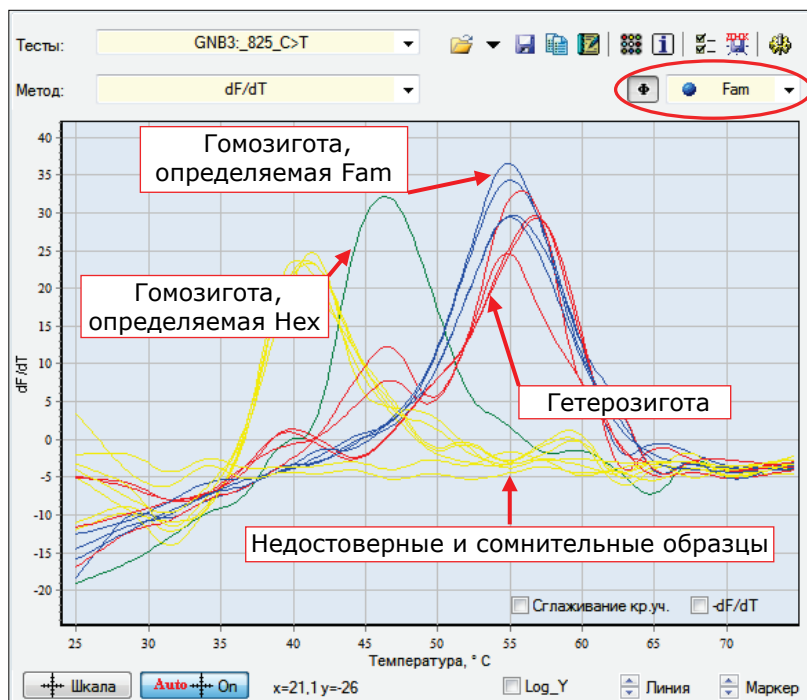
Для лучшей визуализации результатов необходимо скорректировать цветовую гамму пробирок в термоблоке.

Для этого следует открыть инструментальную панель (кнопка ) ,
нажать «Анализ полиморфизмов, плавление» (кнопка ) ,
выбрать «Цветовая гамма пробирок» (кнопка ) .

Образцы, гомозиготные по полиморфизму, определяемому каналом Fam, будут автоматически покрашены в синий цвет; гомозиготные по каналу Hex – в зелёный; гетерозиготные – в красный; сомнительные и недостоверные – в жёлтый.

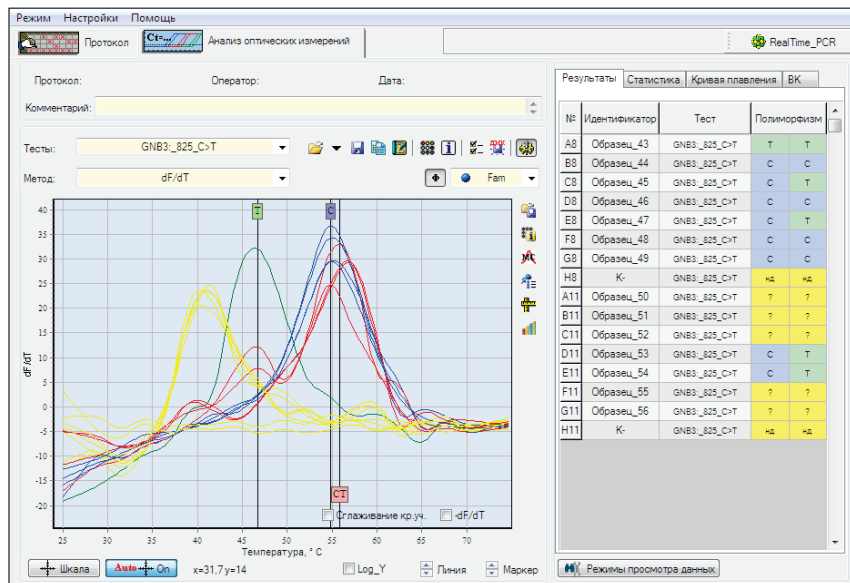
Заданные в тесте (ini файл) температуры плавления продуктов амплификации отражаются на графике в виде температурных баров.

Для вывода на экран температурных баров следует открыть инструментальную панель (кнопка ) ,
нажать «Анализ полиморфизмов, плавление» (кнопка ) ,
выбрать «Температурные бары» (кнопка ) .

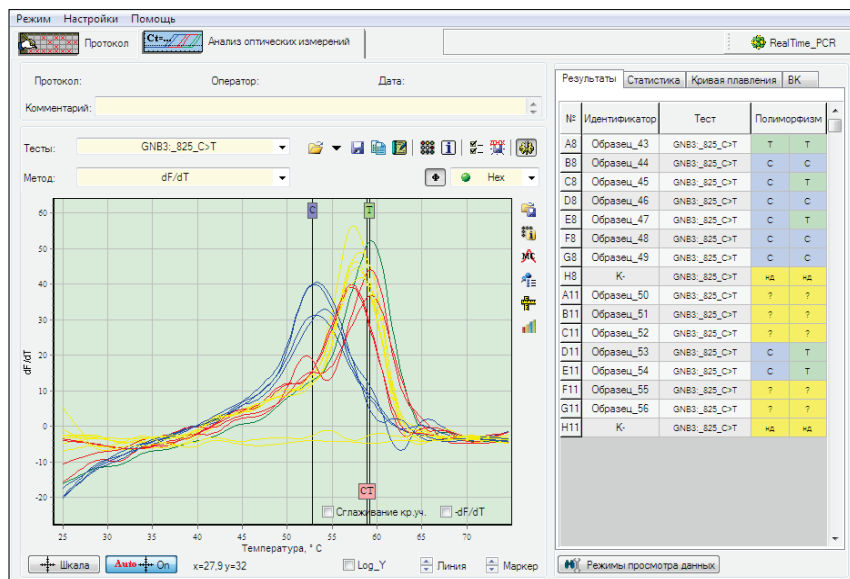


Пример.

Положение температурных баров (канал Fam):



Положение температурных баров (канал Hex):



Примечание – В случае использования многотестового режима или постановки нескольких тестов в протоколе для работы с температурными барами необходимо выбирать по одному тесту.

11 ОШИБКИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПЦР

Одной из наиболее частых ошибок при проведении генотипирования является несоответствие расстановки пробирок в термоблоке прибора, указанной при заполнении протокола.

Пример.

Расстановка пробирок соответствует отмеченной при заполнении протокола, образцы типированы правильно:

Импорт Мультиплекс

Добавить тест
Добавить строку
Удалить строку
Очистить протокол
Отменить изменение

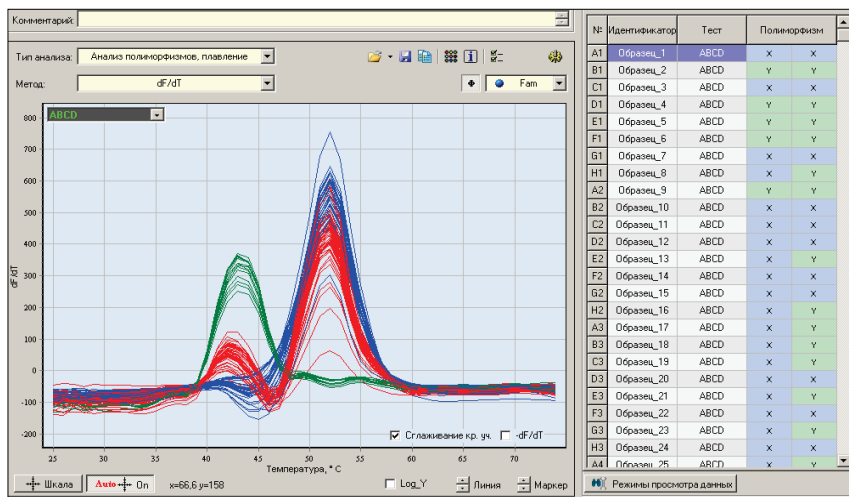
Добавить
до после
Формат
Обычный
Научный

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

☒ Заполнение
Порядок заполнения
☐ "Свободное" заполнение

Очистить поле матрицы

Применить Отмена



Расстановка пробирок не соответствует отмеченной при заполнении протокола, образцы типированы неправильно (генотипы не соответствуют идентификаторам образцов; выделены не совпадающие с правильными генотипы):

Импорт Мультиплекс

Добавить тест

Добавить строку

Удалить строку

Очистить протокол

Отменить действие

Добавить

до после

Формат

Обычный

Научный

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

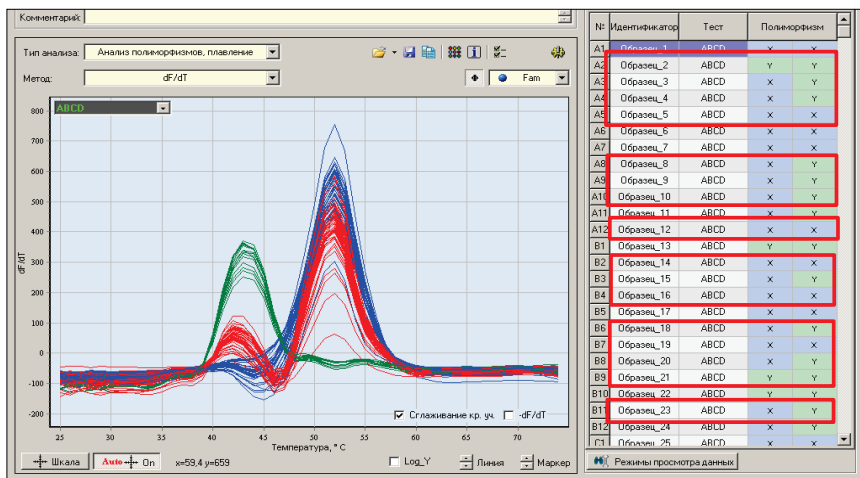
Заполнение

Порядок заполнения

"Свободное" заполнение

Очистить поле матрицы

Применить Отмена



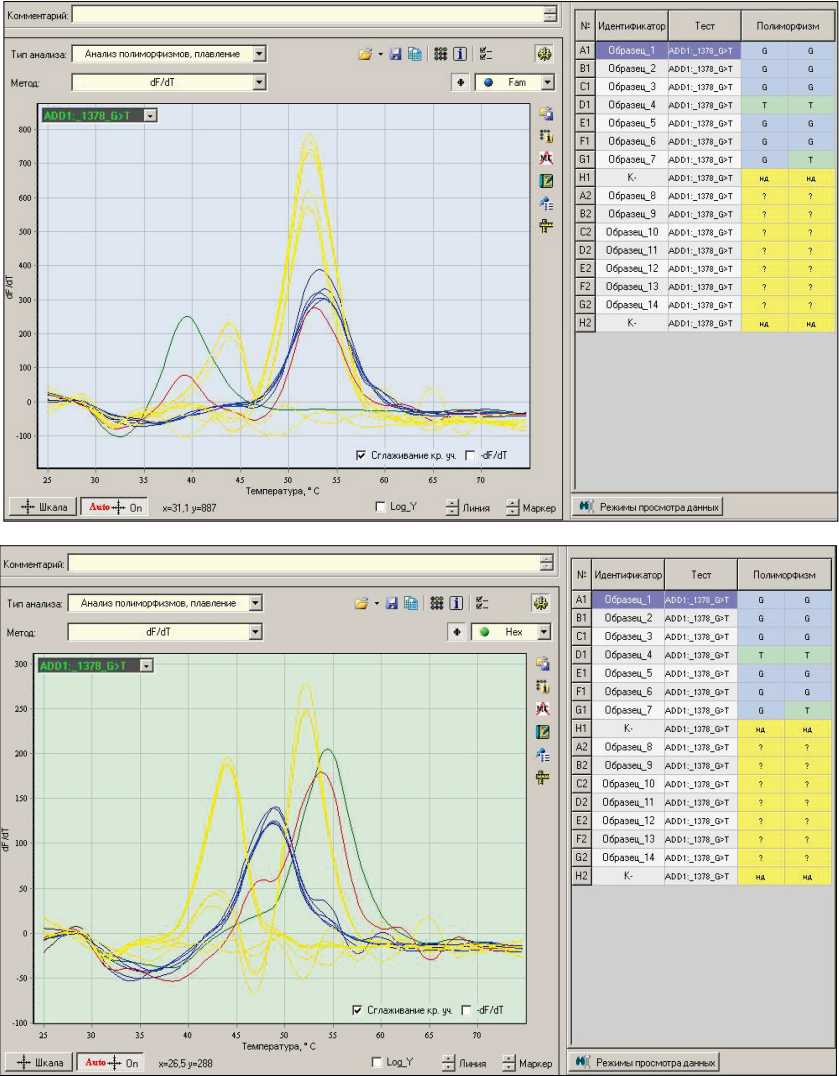
Подобная ошибка может возникнуть также из-за несоблюдения последовательности тестов в группе во время расстановки (при использовании многотестового режима или при постановке разных тестов в одном протоколе).

Другие вероятные ошибки:

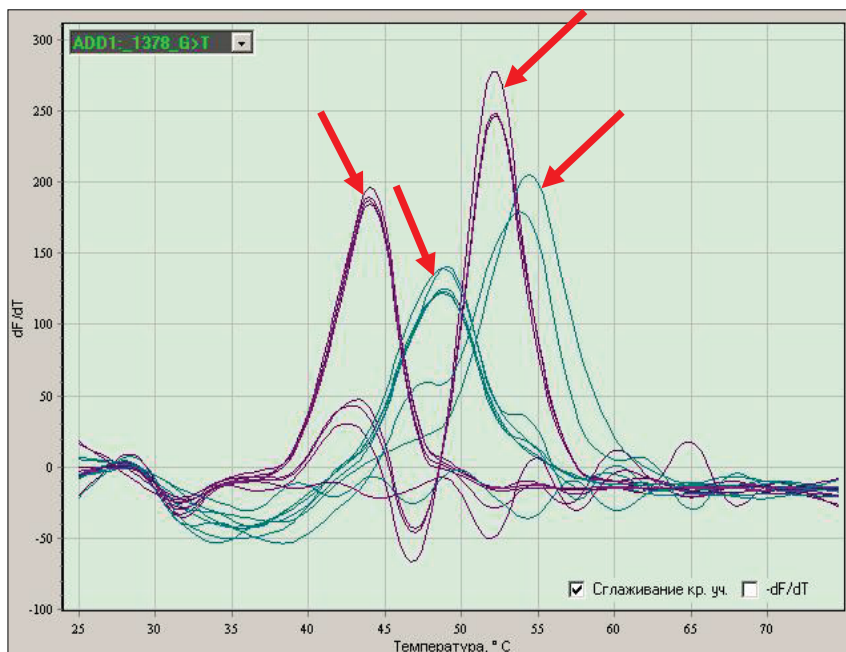
Раскапывание смеси для амплификации другого полиморфизма, неправильное задание теста и др.

Пример.

Заданный тест не соответствует раскапанной смеси (образцы 8-14), образцы не типируются:



В случае подобной ошибки на графиках еще до коррекции цветовой гаммы может быть заметно несовпадение пиков плавления для образцов с правильным и неправильным заданием теста, так как полученные для образцов с неправильно заданным тестом температуры плавления не совпадают с температурами, соответствующими данному тесту:



12 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ КОМПЛЕКТОВ

12.1 Транспортирование

- 12.1.1 Транспортирование осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения реагентов, входящих в состав комплектов.
- 12.1.2 Комплекты реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

12.2 Хранение

- 12.2.1 Комплекты реагентов, за исключением Taq-АТ-полимеразы, следует хранить при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности.

- 12.2.2 Таq-АТ-полимеразу следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности.
- 12.2.3 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С.
- 12.2.4 Комплекты реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

12.3 Указания по эксплуатации

- 12.3.1 Комплекты реагентов должны применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплектов.
- 12.3.2 После вскрытия упаковки компоненты комплектов реагентов следует хранить при следующих условиях:
- компоненты комплектов реагентов, за исключением Таq-АТ-полимеразы, следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.
 - Таq-АТ-полимеразу следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности.
 - смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С.
- 12.4 Комплекты с истекшим сроком годности использованию не подлежат.

13 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 13.1 Комплекты с истёкшим сроком годности и неиспользованные реактивы утилизируют в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 13.2 Непригодные для использования комплекты реагентов, упаковка комплекта реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относятся к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами.

14 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 14.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплектов реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 14.2** Срок годности комплектов реагентов – 6 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для определения генетических полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12, 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/

Адрес производителя:

ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

Код изготовителя указан на этикетке (см. последнюю цифру в серии набора):

- 1) ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.
- 2) ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Приложение А (справочное)

Символы, используемые при маркировке набора

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света