1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор реагентов SNP-ENDOCRIN предназначен для выявления десяти генетических маркеров предрасположенности к эндокринным заболеваниям методом минисеквенирования.

Перечень определяемых однонуклеотидных замен:

№ п/п	Номер мутации	Ген/Полиморфизм
1.	rs5219	KCNJ11 / T>C
2.	rs4253778	PPARA / G>C
3.	rs2016520	PPARD / C>T
4.	rs1801282	PPARG / C>G
5.	rs8192678	PPARGClA / C>T
6.	rs7903146	TCF7L2 / C>T
7.	rs660339	UCP2 / G>A
8.	rs1626521	UCP3 / G>A
9.	rs6902123	PPARD / T>C
10.	rs2076167	PPARD / C>T

Область применения – клиническая диагностика, скрининговые мероприятия.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

– 10х буфер 1 для амплификации, 1 пробирка, (55,0±5,0) мкл;
– 10х буфер 2 для амплификации, 1 пробирка, (55,0±5,0) мкл;
– раствор ДНК полимеразы, 1 пробирка, (25,0±1,0) мкл;
– смесь праймеров plex AMP1, 1 пробирка, (22,0±2,0) мкл;
– смесь праймеров plex AMP2, 1 пробирка, (22,0±2,0) мкл;
– смесь праймеров plex SSHOT1, 1 пробирка, (22,0±2,0) мкл;
– смесь праймеров plex SSHOT2, 1 пробирка, (22,0±2,0) мкл;
– вода для амплификации, 1 пробирка, (1000,0±50,0) мкл;
– вода для SSHOT разведения, 2 пробирки, (1200,0±30,0) мкл;
– положительный контроль, 1 пробирка, (8,0±2,0) мкл.

2.2 Набор рассчитан на проведение 20 определений, включая контрольные образцы. Время проведения анализа не более 7 часов.

2.3 Принцип работы набора.

В основе набора лежит метод минисеквенирования (технология SNaPshot анализа) с постановкой полимеразной цепной реакции и последующей детекцией полученных флуоресцентно меченых фрагментов методом капиллярного электрофореза *in vitro*. Анализ проводится по 10 фрагментам, содержащим на 3’-конце в полиморфной позиции флуоресцентно меченый дидезоксинуклеотид-трифосфат (ддНТФ).

Набор позволяет диагностировать однонуклеотидные замены rs5219, rs4253778, rs2016520, rs1801282, rs8192678, rs7903146, rs660339, rs1626521, rs6902123, rs2076167 в геномной ДНК человека.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые хирургические перчатки без талька, т. к. биологические образцы следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.2 Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с образцами тканей.

3.3 Основные этапы работ должны проводиться в физически изолированных зонах. Всё лабораторное оборудование, а также штативы, пипетки, и др. должны быть промаркированы по принадлежности к соответствующей рабочей зоне. Запрещается перемещение оборудования из одной рабочей зоны в другую.

3.4 Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

3.5 При подготовке реакционной смеси и внесении контрольных и исследуемых образцов, перчатки, штативы, наконечники и пробирки используются только однократно.

3.6 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности при работе с биологическим материалом. В случае пролива образцов тканей и клеток на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию.

3.7 Не допускается повторное замораживание и размораживание готовой смеси для амплификации.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термоциклер BioRad T100 (США), или термоциклер, соответствующие ему по характеристикам;
- Генетический анализатор Hitachi ABI3500 (Applied Biosystems, США) или аналог;
- Бокс для ПЦР с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф;
- Мини центрифуга-вортекс;
- Отдельные наборы пипеток полуавтоматических одноканальных, позволяющих отбирать объемы жидкостей (0,2-2) мкл, (1-10) мкл, (10-100) мкл и (100-1000) мкл аттестованных по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- Отдельные халаты и одноразовые нитриловые перчатки без талька;
- Одноразовые полипропиленовые микропробирки (микропробирки в стрипах, 96-ячеечные микропланшеты) с максимальным объёмом 0,2 мл;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл типа «эппендорф»;
- Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток объемом 0,5-10 мкл, 2-200 мкл;
- Септа для 96-лучного планшета;
- Морозильная камера, отрегулированная на температуру минус 20°С;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Холодильник, отрегулированный на температуру от плюс 2 до плюс 80°С;
- Транспортный контейнер со льдом;
- Штативы для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл;
- Дезинфицирующее средство «Полидез» или аналоги;
- Контейнер для сброса наконечников и использованных пробирок;
- Hi-Di™ Formamide («Thermo Fisher», США, кат.№ 4311320) или аналог;
- GeneScan™ 120 LIZ™ Size Standard («Thermo Fisher», США, кат.№ 4322362);
- POP4 полимер («Thermo Fisher», США, кат.№ A26070) или аналог;
- Нуклеаза ExoI (“NEB”, США, кат.№ M0293S) или аналог;
- Фосфатаза rSAP (“NEB”, США, кат.№ M0371L) или аналог;
- Набор SNaPshot Multiplex Kit («Thermo Fisher», США, кат.№ 4323159);
- Набор флуоресцентных красителей “Matrix Standard Set DS-02” («Thermo Fisher», США, кат.№ 4323014);
- Программное обеспечение GeneMapper.

5 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 Проведение ПЦР для наработки фрагментов ДНК, содержащих анализируемые мутации.

5.1.1. В зоне для постановки ПЦР извлечь из упаковочного пакета и поместить в термостатируемый блок-штатив (+4°С) следующие реагенты:

– 10х буфер 1 для амплификации;
– 10х буфер 2 для амплификации;
– смесь праймеров plex AMP1;
– смесь праймеров plex AMP2;
– вода для амплификации;
– положительный контроль.

5.1.2. После полной разморозки реагентов осадить содержимое микропробирок на дно с помощью центрифуги в течение 5 секунд при 2000 об/мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.1.3. В пробирке вместимостью 0,5 или 1,5 мл приготовить смесь для ПЦР согласно таблице 1.

Таблица 1

Компонент смеси для ПЦР	**Количество реактива на 1 реакцию, мкл**	**Количество реактива на (N+2)* реакций, мкл**
Вода для амплификации	19,9	
10х буфер 1 или 2 для амплификации*	2,5	
Смесь праймеров plexAMP1 или plexAMP 2 *	1	
ДНК-полимераза	0,6	
ИТОГО:	24	

*10х буфер 1 для амплификации всегда используется со смесью праймеров plexAMP1, а 10х буфер 2 для амплификации всегда используется со смесью праймеров plexAMP2

Для исключения контаминации реагентов использовать только одноразовые наконечники с аэрозольным барьером!

После добавления ДНК-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, смесь аккуратно перемешивают пипетированием.

5.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок (пробирок в стрипах) вместимостью 0,2 мкл (исходя из расчета N+2, где N - количество анализируемых образцов + 1 положительный контроль + 1 отрицательный контроль), маркировать пробирки с анализируемыми образцами ДНК «*А*-1» до «*А*-N», «*А*-ОК» для отрицательного контроля и «*А*-ПК» для положительного контролей, соответственно. При этом «*А*» принимает значения 1 или 2, в зависимости от используемого 10х буфера (1 или 2) для амплификации и соответствующей смеси праймеров – plex AMP1 или plex AMP2

5.1.5. Во все микропробирки (микропробирки в стрипах) вместимостью 0,2 мл внести по 24 мкл готовой смеси для ПЦР.

5.1.6. Внести исследуемые образцы ДНК, контрольные образцы ДНК в ПЦР-смесь только одноразовыми наконечниками с аэрозольным барьером.

В микропробирки (микропробирки в стрипе) для отрицательного контроля добавить 1 мкл реактива «Вода для амплификации», перемешать пипетированием 3 раза.

В микропробирки (микропробирки в стрипе) для положительного контроля добавить 1 мкл реактива «Положительный контроль», перемешать пипетированием 3 раза.

В микропробирки (микропробирки в стрипе) для анализируемых образцов ДНК (в соответствии с нумерацией), добавить по 1 мкл образцов ДНК (концентрация ДНК не менее 10 нг/мкл). Перемешать пипетированием 3 раза.

Закрыть микропробирки крышками (стрипом крышек при использовании пробирок в стрипах).

Конечный объём реакционный смеси в каждой пробирке составляет 25 мкл.

5.1.7. Поместить микропробирки в термоблок амплификатора. Закрыть крышку амплификатора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.1.8. Запрограммировать прибор для выполнения температурной программы:

Для plexAMP1:

№ цикла	Температура	Время	Кол-во циклов
1	95˚	3 мин	1
2	95˚	25 сек	30
	66˚	25 сек	
	72˚	35 сек	
3	72˚	7 мин	1
4	10˚	∞	

Для plexAMP2:

№ цикла	Температура	Время	Кол-во циклов
1	95˚	3 мин	1
2	95˚	25 сек	30
	62˚	25 сек	
	72˚	35 сек	
3	72˚	7 мин	1
4	10˚	∞	

5.2 Очистка продуктов ПЦР.

Перед проведением реакции минисеквенирования необходимо очистить продукты ПЦР от неиспользованных олигонуклеотидных праймеров и дНТФ. Для этого:

5.2.1. Отобрать необходимое количество пробирок (пробирок в стрипах) вместимостью 0,2 мкл (исходя из расчета N+2, где N - количество анализируемых образцов + 1 положительный контроль + 1 отрицательный контроль), маркировать пробирки с анализируемыми образцами ДНК «*A*-1» до «*A*-N», «*A*-ОК» для отрицательного контроля и «*A*-ПК» для положительного контролей, соответственно. При этом «*A»* принимает значения 1 или 2, в зависимости от использованного 10х буфера (1 или 2) для амплификации и соответствующей смеси праймеров – plex AMP1 или plex AMP2.

5.2.2. Из микропробирок с амплификационной смесью перенести по 5 мкл продуктов амплификации в чистые пробирки с аналогичными подписями.

5.2.3. В каждую микропробирку добавить 0,5 мкл нуклеазы ExoI и 1 мкл фосфатазы rSAP.

5.2.4. Микропробирки закрыть крышками, содержимое осадить (3000 об/мин, 5 сек), перемешать вортексированием и снова осадить (3000 об/мин, 5 сек) на центрифуге-вортексе.

5.2.5. Поместить микропробирки в амплификатор, закрыть крышку амплификатора. Задать на приборе следующую программу:

- инкубация 37ºС, 60 мин 1 цикл;
- инактивация 75ºС, 15 мин 1 цикл;
- хранение 4ºС.

Режим работы амплификатора – подогреваемая крышка (75ºС), контроль температуры - расчетный.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.2.6. Разморозить реагент «вода для SSHOT разведения».

5.2.7. Микропробирки извлечь из амплификатора, в каждую добавить по 58,5 мкл воды для SSHOT разведения, перемешать вортексированием и осадить.

5.3 Постановка реакции минисеквенирования.

5.3.1. Для постановки реакции минисеквенирования отобрать необходимое количество микропробирок вместимостью 0,2 мкл (исходя из расчета N+2, где N - количество анализируемых образцов + 1 положительный контроль + 1 отрицательный контроль), маркировать пробирки с анализируемыми образцами ДНК «S*A*-1» до «S*A*-N», «S*A*-ОК» для отрицательного контроля и «S*A*-ПК» для положительного контроля, соответственно. При этом «*A*» принимает значения 1 или 2, в зависимости от используемой смеси праймеров – plex SSHOT1 или plex SSHOT2.

5.3.2. Разморозить компоненты набора:

– смесь праймеров plex SSHOT1;

– смесь праймеров plex SSHOT2;

– вода для амплификации.

А также разморозить Ready Reaction Mix (из набора SNaPshot Multiplex Kit), не входящий в состав данного набора.

5.3.3. В пробирке вместимостью 0,5 или 1,5 мл приготовить смесь для минисеквенирования согласно таблице 2.

Таблица 2

Компонент смеси для минисеквенирования	**Количество реактива на 1 реакцию, мкл**	**Количество реактива на (N+2) реакций, мкл**
Ready Reaction Mix (из набора SNaPshot Multiplex Kit)	5	
Вода для амплификации	2,5	
Смесь праймеров plex SSHOT1 или 2	1	
ИТОГО:	8,5 мкл	

5.3.4. Внести в промаркированные микропробирки по 8,5 мкл готовой реакционной смеси для минисеквенирования с учетом типа добавленной смеси праймеров.

5.3.5. В каждую промаркированную пробирку согласно номеру образца и номеру plexSSHOT внести по 1,5 мкл разведенных продуктов амплификации из соответствующих микропробирок, в которые была добавлена вода для SSHOT разведения. Следует учитывать, что смесь для минисеквенирования, содержащая праймеры plex SSHOT1 используется только с разведенными продуктами амплификации, полученными с помощью смеси праймеров plex AMP1, а смесь для минисеквенирования, содержащая праймеры plex SSHOT2 - только с разведенными продуктами амплификации, полученными с помощью смеси праймеров plex AMP2.

5.3.6. Микропробирки закрыть крышками, перемешать вортексированием и осадить на центрифуге-вортексе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.3.7. Поместить микропробирки в амплификатор, закрыть крышку амплификатора. Запрограммировать прибор:

№ цикла	Температура	Время	Кол-во циклов
1	96˚	10 сек	25
	50 ˚	5 сек	
	60˚	30 сек	
2	10˚	∞	

Режим работы амплификатора – подогреваемая крышка (96ºС), контроль температуры: расчетный.

5.4. Очистка продуктов минисеквенирования.

5.4.1. По окончании программы минисеквенирования извлечь микропробирки из амплификатора, в каждую добавить по 1,0 мкл фосфатазы rSAP, микропробирки закрыть крышками, содержимое осадить, перемешать вортексированием и снова осадить.

5.4.2. Поместить микропробирки в амплификатор, закрыть крышку амплификатора. Задать следующие параметры эксперимента:

- инкубация 37ºС, 60 мин 1 цикл;
- инактивация 75ºС, 15 мин 1 цикл;
- хранение 4ºС.

Режим работы амплификатора – подогреваемая крышка (75ºС), контроль температуры - расчетный.

5.4.3. По окончании процедуры очистки продукты минисеквенирования поместить на +4°С, если предполагается немедленный анализ, или заморозить на -20°С для длительного хранения.

5.5 Подготовка продуктов реакции минисеквенирования к SnapShot анализу.

5.5.1. В расчете на одну лунку 96-луночного планшета добавить по 9 мкл «Hi-Di» формамида, 0,25 мкл размерного стандарта «GeneScan LIZ120 Size Std Kit», 1 мкл продукта реакции минисеквенирования одной из промаркированных пробирок.

5.5.2. Планшет закрыть септой, поместить в амплификатор и провести тепловую денатурацию при 95°С в течение 5 минут с последующим охлаждением до 10ºС (крышку амплификатора при этом оставляют открытой).

5.5.3. Планшет поместить в генетический анализатор и запустить SnapShot анализ.

5.6 Анализ полученных результатов

Для анализа результатов SnapShot реакции создать маркерные панели для идентификации аллелей в соответствии с протоколами «Руководства пользователя» для ДНК секвенатора (капилляры длиной 36 см, POP-4 полимером и внутренним размерным стандартом «GS120LIZ») с использованием опции «Panel manager» программы «GeneMapper® 4» (таблица 3).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3

Маркер	Диапазон длины фрагмента							
	A		G		C		T	
	от	до	от	до	от	до	от	до
Plex1								
rs4253778	-	-	35,9	36,4	36,7	37,2	-	-
rs2016520	34,4	35,0	30,7	31,5	-	-	-	-
rs1801282	-	-	40,3	40,8	40,9	41,5	-	-
rs8192678	44,1	44,5	42,9	43,3	-	-	-	-
rs7903146	-	-	-	-	45,7	46,1	46,3	46,7
Plex2								
rs5219	-	-	-	-	30,6	31,4	32,3	33,0
rs1626521	51,5	52,0	50,2	50,8	-	-	-	-
rs2076167	55,3	55,8	54,0	54,5	-	-	-	-
rs660339	61,2	61,9	60,0	60,5	-	-	-	-
rs6902123	64,9	65,4	63,8	64,4	-	-	-	-

Согласно таблице 4 провести анализ полученных пиков на присутствие того или иного нуклеотида в анализируемом локусе. Высота целевых пиков должна составлять не менее 50 ОЕФ.

5.7 Анализ результатов минисеквенирования для контролей.

Положительный контроль в результате реакции минисеквенирования со смесью праймеров plex1 должен демонстрировать следующий генотип:

	rs2016520	**rs4253778**	**rs1801282**	**rs8192678**	**rs7903146**
ПК1	AA (TT*)	GG	CC	GG(CC*)	CC

*-генотип маркера после интерпретации результата

Положительный контроль в результате реакции минисеквенирования со смесью праймеров plex2 должен демонстрировать следующий генотип:

	rs5219	**rs660339**	**rs1626521**	**rs6902123**	**rs2076167**
ПК2	CT	AA	GA	AA(TT*)	AA(TT*)

*-генотип маркера после интерпретации результата

В отрицательном контроле не должны визуализироваться отдельные пики или совокупность пиков, соответствующие по размеру и флуоресценции фрагментам из таблицы 3 и имеющие интенсивность (высота по оси ординат), сопоставимую с интенсивностью пиков аналогичного локуса положительного контроля ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4

Маркер	Ген	Результат эксперимента	Интерпретация результата эксперимента	Примечание
Plex1				
rs4253778	PPARA	G C	G C	
rs2016520	PPARD	G A	C T	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs1801282	PPARG	C G	C G	
rs8192678	PPARG ClA	G A	C T	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs7903146	TCF7L2	C T	C T	
Plex2				
rs5219	KCNJ11	T C	T C	
rs660339	UCP2	G A	G A	
rs1626521	UCP3	G A	G A	
rs6902123	PPARD	A G	T C	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs2076167	PPARD	G A	C T	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте

Полиморфизмы генов ассоциированы с предрасположенностью к развитию ожирения, атеросклероза, диабета и других заболеваний. Данные по каждому маркеру приведены в таблице 5. Результаты должны интерпретироваться врачом в комплексе с другими генетическими, анамнестическими, клиническими и лабораторными данными.

Таблица 5

Маркер	Ген	Ассоциация маркера с заболеваниями	Расшифровка генотипа
rs5219	KCNJ11	Врожденный гиперинсулинизм, неонатальный сахарный диабет, гестационный диабет.	C/C – нормальная работа АТФ-зависиемых калиевых каналов в бета-клетках поджелудочной железы. C/T и T/T – нарушение работы АТФ-зависимых калиевых каналов в бета-клетках поджелудочной железы, риск повышения уровня глюкозы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

rs4253778	PPARA	Алкогольная кардиомиопатия, жировая болезнь печени, диабет 2 типа, ожирение, метаболический синдромом.	Аллель G увеличивает риск развития диабета 2 типа.
rs2016520	PPARD	Ожирение, атеросклероз и диабет 2 типа.	G/G и A/G генотипы – снижение жировой массы тела, уровня липидов и увеличение относительного объема мышц происходит значительно медленнее, чем у людей с генотипом A/A, из-за влияния гена *PPARD* на активацию функции митохондрий, аэробную физическую подготовку и чувствительность к инсулину.
rs1801282	PPARG	Неинсулинозависимый диабет, семейная липидодистрофия, ожирение.	G/G генотип - индекс массы тела, уровень свободных жирных кислот и лейкоцитов ниже, чем с C/C и C/G.
rs8192678	PPARGC1A	Артериальное давление, регуляция клеточного гомеостаза холестерина и развитии ожирения.	У носителей минорного аллеля T по маркеру - снижение жировой массы тела, уровня липидов и увеличение относительного объема мышц происходит значительно медленнее, чем у людей с основным аллелем C.
rs7903146	TCF7L2	Наиболее значимый генетическим маркер, ассоциированный с высоким риском развития диабета 2 типа.	Аллель T является фактором риска, аллель C является нормой.
rs660339	UCP2	Генетические изменения в UCP2 влияют на патогенез ожирения и сахарного диабета 2 типа.	Генотип AA повышает риск развития сахарного диабета 2 типа.
rs1626521	UCP3	Мутации в гене UCP3 связаны с ожирением. Мутация в экзоне 3 (V102I) была диагностирована у тучных и диабетиков.	A/A и G/A – нормальная экспрессия UCP3. G/G - наблюдается более высокий порог насыщения (большее потребление калорий), больший объем желудка после насыщения,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

			что может приводить к развитию либо прогрессированию ожирения.
rs6902123	PPARD	Предрасположенность к развитию ожирения, атеросклероза и диабета.	T/T – нормальный метаболизм глюкозы. T/C и C/C – повышенный риск развития инсулинрезистентности и диабета 2 типа.
rs2076167	PPARD	Предрасположенность к развитию ожирения, атеросклероза и диабета.	T/T – нормальный вес. T/C и C/C – повышенный риск развития ожирения.

6 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

6.1 Набор должен храниться при температуре минус (12-18)°С в защищённом от света месте в течение всего срока годности. Допускается повторное замораживание и размораживание компонентов набора.

6.2 Не смешивать реагенты из разных партий.

6.3 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать автоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованными на точность по значению средней дозы и сходимость результатов пипетирования.

6.4 Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

6.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

6.6 При несоблюдении правил хранения и транспортировки набора, а также других пунктов настоящей инструкции, производитель не несёт ответственности за результаты анализа.

6.7 Срок годности набора 6 месяцев.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru