УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Здравоохранения РБ
_____ Б.Н. Андросюк
"___"_____ 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ SNP4-OBST «SNP4-OBST»

«СОГЛАСОВАНО»
Заместитель директора
УП «Центр экспертиз
и испытаний в здравоохранении»
_____ М.И. Злотникова
"___"_____ 20 г
«СОГЛАСОВАНО»
Директор Института
биоорганической химии НАН
Беларуси
_____ С.В.Бабицкая
"___"_____ 20 г.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор реактивов «SNP4-OBST» предназначен для выявления одиннадцати генетических маркеров предрасположенности к ожирению методом минисеквенирования.

Перечень определяемых однонуклеотидных замен:

№ п/п	Номер мутации	Ген/Полиморфизм
1.	rs10852521	FTO / T>C, T>A
2.	rs11075990	FTO/ A>G
3.	rs1121980	FTO/ G>A, G>C
4.	rs1421085	FTO/ T>C
5.	rs1477196	FTO/ A>G
6.	rs17817449	FTO/ T>G, T>A
7.	rs3751812	FTO/ G>T
8.	rs7206790	FTO/ C>G
9.	rs8047395	FTO/ G>A
10.	rs9940128	FTO/ G>A
11.	rs1137101	LEPR/ A>G

*Набор рассчитан на анализ **20 образцов ДНК.***
Продолжительность анализа по 11 маркерам 7 часов.

2. СОСТАВ НАБОРА РЕАКТИВОВ «SNP4-OBST»

В состав набора входят следующие компоненты:

– 10х буфер для амплификации, 1 пробирка, (60,0±5,0) мкл;
– раствор ДНК полимеразы, 1 пробирка, (10,0±2,0) мкл
– смесь праймеров plex AMP, 1 пробирка, (60,0±5,0) мкл;
– смесь праймеров plex SSHOT, 1 пробирка, (22,0±2,0) мкл;
– вода для амплификации, 1 пробирка, (500,0±50,0) мкл;
– вода для SSHOT разведения, 1 пробирка, (1200,0±30,0) мкл;
– положительный контроль, 1 пробирка, (8,0±2,0) мкл.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать одноразовые нитриловые 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 ДНК.

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 для полуавтоматических дозаторов использовать наконечники с аэрозольным барьером.

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

3.5 При приготовлении 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

Для постановки полимеразной цепной реакции и реакций минисеквенирования необходимы следующие оборудование и материалы:

1. Термоциклеры BioRad T100 (США), или термоциклеры, соответствующие ему по характеристикам;
2. Генетический анализатор Hitachi ABI3500 (Applied Biosystems, США) или соответствующий ему по характеристикам;
3. Бокс для ПЦР с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф;
4. Мини центрифуга-вортекс;
5. Центрифуга для планшет;
6. 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 %);
7. Отдельные халаты и одноразовые нитриловые перчатки без талька;
8. Одноразовые полипропиленовые микропробирки (микропробирки в стрипах, 96-ячеечные микропланшеты) с максимальным объёмом 0,2 мл;
9. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл типа «эппендорф»;
10. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток объемом 0,5-10мкл, 2-200 мкл;
11. Септа для 96-лучного планшета;
12. Морозильная камера, отрегулированная на температуру минус 20°С;
13. Холодильник, отрегулированный на температуру от плюс 2 до плюс 8°С;
14. Транспортный контейнер со льдом;
15. Штативы для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл;
16. Дезинфицирующее средство «Квикдез» или его аналоги;
17. Hi-Di™ Formamide («Thermo Fisher», США, кат.№ 4311320) или его аналоги;
18. GeneScan™ 120 LIZ™ Size Standard («Thermo Fisher», США, кат.№ 4324287);
19. POP4 полимер («Thermo Fisher», США, кат.№ 4393710);
20. Нуклеаза ExoI (“NEB”, США, кат.№ M0293S) или ее аналоги;
21. Фосфатаза rSAP (“NEB”, США, кат.№ M0371L) или ее аналоги;
22. Набор SNaPshot Multiplex Kit («Thermo Fisher», США, кат.№ 4323159);
23. Набор флуоресцентных красителей “Matrix Standard Set DS-02” («Thermo Fisher», США, кат.№ 4323014)
24. Программное обеспечение GeneMapper.

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

5. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

5.1 Проведение ПЦР для наработки фрагментов ДНК, содержащих анализируемые мутации

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

– 10х буфер для амплификации
– смесь праймеров plex AMP
– положительный контроль
– вода для амплификации

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

3. В пробирке вместимостью 0,5 или 1,5 мл приготовить смесь для ПЦР согласно Таблице 1.

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

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

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 «1» до «N», «ОК» для отрицательного контроля и «ПК» для положительного контролей, соответственно.

Таблица 1

Компонент смеси для ПЦР	**Количество реактива на 1 реакцию, мкл**	**Количество реактива на (N+2) реакций, мкл**
Вода для амплификации	18,8	
10х буфер для амплификации	2,5	
Смесь праймеров plex AMP	2,5	
Раствор ДНК-полимеразы	0,2	
ИТОГО:	24 мкл	

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

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

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

В микропробирку (микропробирку 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.

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

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

8. Запрограммировать прибор для выполнения температурной программы:

№ цикла	Температура, ºС	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин	1
2	95	30 сек	30
	62	30 сек	
	72	30 сек	
3	72	5 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:

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 «1» до «N», «ОК» для отрицательного контроля и «ПК» для положительного контроля, соответственно.

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

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

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

37ºС, 60 мин 1 цикл
75ºС, 15 мин 1 цикл
4 ºС - хранение

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

6. Разморозить реактив «вода для SSHOT разведения».

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

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-1» до «S-N», «S-ОК» для отрицательного контроля и «S-ПК» для положительного контролей, соответственно.

2. Разморозить компоненты набора

– смесь праймеров plex SSHOT
– вода для амплификации

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

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

4. Внести в промаркированные микропробирки по 8,5 мкл готовой реакционной смеси для минисеквенирования.

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

5. В каждую промаркированную пробирку согласно номеру образца внести по 1,5 мкл разведенных продуктов амплификации из соответствующих микропробирок, в которые была добавлена вода для SSHOT разведения.

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 SSHOT	1	
ИТОГО:	8,5	

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

7. Поместить микропробирки в амплификатор, закрыть крышку амплификатора. Запрограммировать прибор.

№ цикла	Температура, ºС	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

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.

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

37ºС, 60 мин 1 цикл
75ºС, 15 мин 1 цикл
4 ºС - хранение

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

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

5.5 Подготовка продуктов реакции минисеквенирования к SNaPshot анализу

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

2. Планшет закрыть септой, осадить содержимое на центрифуге для планшет (5сек, 2000 об/мин), далее планшет поместить в амплификатор и провести тепловую денатурацию при 95ºС в течение 5 минут с последующим охлаждением до 10 ºС (крышку амплификатора при этом оставляют открытой).

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

3. Содержимое планшета осадить на центрифуге для планшет (5сек, 2000 об/мин), далее планшет поместить в генетический анализатор и запустить SNaPshot анализ. Для проведения SNaPshot анализа, в генетический анализатор должны быть установлены полимер POP-4 и капилляры длиной 36см, также проведена спектральная калибровка с использованием набора флуоресцентных красителей «Matrix Standard Set DS-02». Все действия с прибором должны проводится согласно «Руководству пользователя» для данной модели ДНК секвенатора.

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®» (Таблица 3).

Таблица 3

Маркер	**Диапазон фрагмента**							
	A		G		C		T	
	от	до	от	до	от	до	от	до
Plex SSHOT								
rs10852521	35,8	36,0	-	-	34,85	35,95	35,9	36,85
rs11075990	-	-	-	-	39,3	39,92	40,5	41,1
rs1121980	46,45	47,2	45,2	45,83	45,8	46,2	-	-
rs1421085	-	-	-	-	54,1	54,7	55,4	55,95
rs1477196	-	-	-	-	55,5	56,0	56,5	56,9
rs17817449	59,8	60,0	58,8	59,5	-	-	60,1	60,5
rs3751812	-	-	63,8	64,5	-	-	64,8	65,4
rs7206790	-	-	76,4	76,9	75,7	76,3	-	
rs8047395	80,8	81,5	80,1	80,6	-	-	-	-
rs9940128	49,2	49,8	48,5	49,0	-	-	-	-
rs1137101	96,4	97,3	96,3	96,8	-	-	-	-

Согласно Таблице 4 провести анализ полученных пиков на присутствие того или иного нуклеотида в анализируемом локусе.

Таблица 4

Маркер	**Ген**	**Результат эксперимента**	**Интерпретация результата эксперимента**	**Примечание**
rs10852521	FTO	A C T	A C T	
rs11075990	FTO	C T	G A	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs1121980	FTO	A G C	A G C	

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

rs1421085	FTO	C T	C T	
rs1477196	FTO	C T	G A	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs17817449	FTO	A G T	A G T	
rs3751812	FTO	G T	G T	
rs7206790	FTO	G C	C G	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs8047395	FTO	A G	A G	
rs9940128	FTO	A G	A G	
rs1137101	LEPR	A G	A G	

Полиморфизмы генов ассоциированы с предрасположенностью к развитию ожирения и сопутствующих ему 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/Полиморфизм**	**Ассоциация маркера с заболеваниями**	**Расшифровка генотипа**
rs10852521	FTO / T>C, T>A	Узлы щитовидной железы у пациентов с лишним весом	T/T – повышен риск развития узлов щитовидной железы у пациентов с лишним весом
rs11075990	FTO/ A>G	Ожирение	Фактор риска - присутствие аллеля G
rs1121980	FTO/ G>A, G>C	Ожирение	A/A и G/A – повышен риск развития ожирения
rs1421085	FTO/ T>C	Ожирение	Фактор риска - присутствие аллеля C
rs1477196	FTO/ A>G	Ожирение	Фактор риска - присутствие аллеля G
rs17817449	FTO/ T>G, T>A	Ожирение	G/T и G/G - повышен риск развития ожирения
rs3751812	FTO/ G>T	Ожирение	G/T и T/T – повышен риск развития ожирения
rs7206790	FTO/ C>G	Ожирение	G/G – существенно повышен риск развития ожирения

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

rs8047395	FTO/ G>A	Метаболический синдром	G/G – повышен риск развития метаболического синдрома
rs9940128	FTO/ G>A	Ожирение	Фактор риска - присутствие аллеля А
rs1137101	LEPR/ A>G	Ожирение	G/G – повышен риск развития ожирения

5.7 Анализ результатов минисеквенирования для контрольных образцов

Контрольный образец в результате реакции минисеквенирования со смесью праймеров plex SSHOT должен демонстрировать генотипы, указанные в паспорте к контрольному образцу.

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.

Высота целевых пиков должна составлять не менее 50 ОЕФ.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

1. Набор должен храниться при температуре минус (12-18) ºС в защищённом от света месте в течение всего срока годности.
2. Не смешивать реактивы из разных партий.
3. Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать автоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованными на точность по значению средней дозы и сходимость результатов пипетирования.
4. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.
5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.
6. При несоблюдении правил хранения и транспортировки набора, а также других пунктов настоящей инструкции, производитель не несёт ответственности за результаты анализа.
7. Срок годности набора 6 месяцев.

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