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

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ SNP5-DIAB «SNP5- DIAB»

«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.

20__

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор реактивов «SNP5-DIAB» предназначен для выявления десяти генетических маркеров, связанных с риском инсулинрезистентности и сахарного диабета методом минисеквенирования.

Перечень определяемых однонуклеотидных замен:

№ п/п	Номер мутации	Ген/Полиморфизм
1.	rs1175543	PPARG/ A>G
2.	rs709158	PPARG/ A>G
3.	rs135551	PPARA/ G>A
4.	rs11196205	TCF7L2/ G>C
5.	rs12243326	TCF7L2/ T>C
6.	rs12255372	TCF7L2/ G>T, G>A
7.	rs4506565	TCF7L2/ A>T, A>G
8.	rs7895340	TCF7L2/ G>A
9.	rs7901695	TCF7L2/ T>C
10.	rs17782313	MC4R/ T>C

.

*Набор рассчитан на анализ **20 образцов ДНК.***
Продолжительность анализа по 10 маркерам 7 часов.

2. СОСТАВ НАБОРА РЕАКТИВОВ «SNP5-DIAB»

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, (110,0±2,0) 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

3.5При 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. 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 %);
6. Отдельные халаты и одноразовые нитриловые перчатки без талька;
7. Одноразовые полипропиленовые микропробирки (микропробирки в стрипах, 96-ячеечные микропланшеты) с максимальным объёмом 0,2 мл;
8. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл типа «эппендорф»;
9. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток объемом 0,5-10мкл, 2-200 мкл;
10. Септа для 96-лучного планшета;
11. Морозильная камера, отрегулированная на температуру минус 20°С;
12. Холодильник, отрегулированный на температуру от плюс 2 до плюс 8^0С;
13. Транспортный контейнер со льдом;
14. Штативы для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл;
15. Дезинфицирующее средство «Полидез» или его аналоги;
16.
17. Hi-Di™ Formamide («Thermo Fisher», США, кат.№ 4311320) или его аналоги;
18. GeneScan™ 120 LIZ™ Size Standard («Thermo Fisher», США, кат.№ 4322362);
19. POP4 полимер («Thermo Fisher», США, кат.№ 4393710);
20. Нуклеаза ExoI (“NEB”, США, кат.№ M0293S) или его аналоги;
21. Фосфатаза rSAP (“NEB”, США, кат.№ M0371L) или его 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^{0}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	16,3	
10х буфер для амплификации	2,5	
Смесь праймеров plex AMP	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 для отрицательного контроля добавить 1 мкл реактива «Вода для амплификации», перемешать пипетированием 3 раза.

В микропробирку 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 контролей, 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.

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

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

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 мкл	

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

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

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

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

3. Планшет поместить в генетический анализатор и запустить SNaPshot анализ. Для проведения SNaPshot анализа в генетический анализатор должны быть установлены полимер

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

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 полимер и внутренний размерный стандарт «GS120LIZ») с использованием опции «Panel manager» программы «GeneMapper® 4» (таблица 3).

Таблица 3

Маркер	Диапазон длины фрагмента							
	A		G		C		T	
	от	до	от	до	от	до	от	до
rs 1175543					28,4	29,2	30,0	30,8
rs 709158	40,0	41,0	37,8	38,8				
rs 135551	42,5	43,16	41,0	41,75				
rs 11196205			43,5	44,0	44,3	44,65		
rs 12243326					50,5	51,0	51,2	51,7
rs 12255372	52,0	54,0	52,0	52,7			53,4	54,0
rs 4506565	58,1	58,74	57,88	58,15			58,16	58,6
rs 7895340	60,5	61,25	60,0	60,65				
rs 7901695	66,0	66,76	65,0	65,8				
rs 17782313					70,5	71,08	71,4	71,81

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**
rs 1175543	PPARG	C T	G A	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs 709158	PPARG	A G	A G	
rs 135551	PPARA	G A	G A	
rs 11196205	TCF7L2	G C	G C	

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

rs 12243326	TCF7L2	T C	T C	
rs 12255372	TCF7L2	G T A	G T A	
rs 4506565	TCF7L2	A T G	A T G	
rs 7895340	TCF7L2	G A	G A	
rs 7901695	TCF7L2	A G	T C	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs 17782313	MC4R	T C	T C	

Полиморфизмы генов ассоциированы с предрасположенностью к развитию сахарного диабета 2 типа. 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**
rs1175543	PPARG/ A>G	Сахарный диабет 2 типа	G/G – существенно повышен риск развития СД2
rs709158	PPARG/ A>G	Сахарный диабет 2 типа	G/G – существенно повышен риск развития СД2
rs135551	PPARA/ G>A	Сахарный диабет 2 типа	A/G и A/A - повышен риск развития СД2
rs11196205	TCF7L2/ G>C	Сахарный диабет 2 типа	C/C и G/C – повышен риск развития СД2
rs12243326	TCF7L2/ T>C	Сахарный диабет 2 типа	Фактор риска - присутствие аллеля C
rs12255372	TCF7L2/ G>T, G>A	Сахарный диабет 2 типа	Присутствие аллеля T значительно повышает риск СД2, как при генотипах T/T, так и G/T
rs4506565	TCF7L2/ A>T, A>G	Сахарный диабет 2 типа	Аллель T ассоциирован с пониженным уровнем инсулина, глюкагона и повышенным риском развития диабета. У носителей генотипа A/T риск диабета 2 типа повышен в 1,3 раза, генотипа T/T - в 1,8 раза
rs7895340	TCF7L2/ G>A	Сахарный диабет 2 типа	A/G и A/A - повышен риск развития СД2
rs7901695	TCF7L2/ T>C	Сахарный диабет 2 типа	Фактор риска - присутствие

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

			аллеля С
rs17782313	MC4R/ T>C	Ожирение	Аллель С ассоциирован с повышением индекса массы тела, снижением насыщения при приеме пищи и риском набора веса, что в дальнейшем является фактором способствующим развитию СД2. Т/Т – нормальный вес, С/Т и С/С - повышен риск развития ожирения особенно при генотипе С/С

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