

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра  
Здравоохранения РБ  
\_\_\_\_\_ Б.Н. Андросюк  
"\_\_\_" \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ  
НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ  
SNP2-TMG  
«SNP2-TMG»

«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.

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор реактивов «SNP2-TMG» предназначен для выявления десяти генетических маркеров предрасположенности к тромбогенным заболеваниям методом минисеквенирования.

Перечень определяемых однонуклеотидных замен:

| № п/п | Номер мутации | Ген/Полиморфизм |
|-------|---------------|-----------------|
| 1.    | rs7412        | APOE CYS112ARG  |
| 2.    | rs429358      | APOE ARG158CYS  |
| 3.    | rs6050        | FI THR312ALA    |
| 4.    | rs11549465    | HIF1A C1772T    |
| 5.    | rs6025        | FV ARG506GLN    |
| 6.    | rs1799963     | FII G20210A     |
| 7.    | rs2010963     | VEGF G634C      |
| 8.    | rs1801131     | MTHFR A1298C    |
| 9.    | rs1801133     | MTHFR C677T     |
| 10.   | rs1799889     | PAI-I 4G/5G     |

*Набор рассчитан на анализ 20 образцов ДНК.*

*Продолжительность анализа по 10 маркерам 7 часов.*

## 2. СОСТАВ НАБОРА РЕАКТИВОВ «SNP2-TMG»

В состав набора входят следующие компоненты:

- 10х буфер для амплификации, 1 пробирка, (110,0±10,0) мкл;
- раствор ДНК полимеразы, 1 пробирка, (10,0±2,0) мкл;
- 5х энхансер, 1 пробирка, (110,0±5,0) 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.

## 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.

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:

- Термоциклеры BioRad T100 (США), или термоциклеры, 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 0,5-10мкл, 2-200 мкл;
- Септа для 96-луночного планшета;
- Морозильная камера, отрегулированная на температуру минус 20°C;
- Холодильник, отрегулированный на температуру от плюс 2 до плюс 8°C;
- Транспортный контейнер со льдом;
- Штативы для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл;
- Дезинфицирующее средство «Квикдез»;
- Hi-Di™ Formamide («Thermo Fisher», США, кат.№ 4311320) или аналог;
- GeneScan™ 120 LIZ™ Size Standard («Thermo Fisher», США, кат.№ 4322362);

- РОР4 полимер («Thermo Fisher», США, кат.№ 4393710);
- Нуклеаза EhoI (“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. 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°C) следующие реактивы:

- 10х буфер для амплификации;
- 5х энхансер;
- смесь праймеров plex AMP1;
- смесь праймеров plex AMP2;
- 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.

Таблица 1.

| Компонент смеси для ПЦР    | Количество реактива на 1 реакцию, мкл |                        | Количество реактива на (N+2)* реакций, мкл |                        |
|----------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------|------------------------|
|                            | Для реакции с plexAMP1                | Для реакции с plexAMP2 | Для реакции с plexAMP1                     | Для реакции с plexAMP2 |
| Вода для амплификации      | 15,3                                  | 20,3                   |                                            |                        |
| 10х буфер для амплификации | 2,5                                   | 2,5                    |                                            |                        |
| 5х энхансер                | 5,0                                   | -                      |                                            |                        |
| Смесь праймеров plexAMP1   | 1,0                                   | -                      |                                            |                        |
| Смесь праймеров plexAMP2   | -                                     | 1,0                    |                                            |                        |
| Раствор ДНК полимеразы     | 0,2                                   | 0,2                    |                                            |                        |
| ИТОГО:                     | 24,0                                  | 24,0                   |                                            |                        |

**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 «А-1» до «А-N», «А-ОК» для отрицательного контроля и «А-ПК» для положительного контроля, соответственно. При этом «А» принимает значения 1 или 2, в зависимости от используемой смеси праймеров – plex AMP1 или plex AMP2.

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 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.

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

Конечный объём реакционной смеси в каждой пробирке составляет 25 мкл.

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

8. Запрограммировать прибор для выполнения температурной программы:

| № цикла | Температура, °C | Время  | Кол-во циклов |
|---------|-----------------|--------|---------------|
| 1       | 95              | 5 мин  | 1             |
| 2       | 95              | 30 сек | 30            |
|         | 68              | 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 «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 используемой смеси праймеров – plex AMP1 или plex AMP2.

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 EhoI 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:

37°C, 60 мин 1 цикл;

75°C, 15 мин 1 цикл;

4 °C – хранение.

Режим работы амплификатора – подогреваемая крышка (75°C), 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 «SA-1» до «SA-N», «SA-ОК» для отрицательного контроля и «SA-ПК» для положительного контролей, соответственно. При этом «А» принимает значения 1 или 2, в зависимости от используемой смеси праймеров – plex SSHOT1 или plex SSHOT2.

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.

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) | 5,0                                   |                                           |
| Вода для амплификации                                 | 2,5                                   |                                           |
| Смесь праймеров plex SSHOT1 или SSHOT2                | 1,0                                   |                                           |
| ИТОГО:                                                | 8,5                                   |                                           |

4. Внести в промаркированные микропробирки по 8,5 мкл готовой реакционной смеси для минисеквенирования с учетом типа добавленной смеси праймеров plexSSHOT1 или 2.

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.

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

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

| № цикла | Температура, °C | Время  | Кол-во циклов |
|---------|-----------------|--------|---------------|
| 1       | 96              | 10 сек | 25            |
|         | 50              | 5 сек  |               |
|         | 60              | 30 сек |               |
| 2       | 10              | ∞      |               |

Режим работы амплификатора – подогреваемая крышка (96°C), 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:

37°C, 60 мин 1 цикл;

75°C, 15 мин 1 цикл;

4 °C – хранение.

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

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

5.5 Подготовка продуктов реакции минисеквенирования к SNaPshot анализу.

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.

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

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® 4» (таблица 3).

Таблица 3

| Маркер             | Диапазон фрагмента |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                    | A                  |       | G     |       | C     |       | T     |       |
|                    | от                 | до    | от    | до    | от    | до    | от    | до    |
| <b>Plex SSHOT1</b> |                    |       |       |       |       |       |       |       |
| rs1801131          | 49,25              | 49,85 | -     | -     | 48,1  | 48,5  | -     | -     |
| rs6025             | 43,6               | 44,1  | -     | -     | 42,2  | 42,6  | 42,8  | 43,3  |
| rs11549465         | 41,95              | 42,35 | 40,75 | 41,25 | -     | -     | -     | -     |
| rs429358           | -                  | -     | -     | -     | 32,0  | 32,8  | 33,2  | 33,95 |
| rs7412             | 29,9               | 30,6  | 27,3  | 28,0  | -     | -     | -     | -     |
| <b>Plex SSHOT2</b> |                    |       |       |       |       |       |       |       |
| rs1799963          | -                  | -     | -     | -     | 41,15 | 41,6  | 42,0  | 42,55 |
| rs6050             | 40,55              | 41,1  | 38,75 | 39,25 | -     | -     | -     | -     |
| rs1799889          | -                  | -     | -     | -     | 57,1  | 57,45 | 57,65 | 58,2  |
| rs2010963          | -                  | -     | 30,15 | 30,95 | 31,7  | 32,5  | 33,0  | 33,8  |

|           |   |   |      |       |       |       |       |       |
|-----------|---|---|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| rs1801133 | - | - | 46,0 | 46,55 | 47,45 | 47,95 | 52,85 | 53,45 |
|-----------|---|---|------|-------|-------|-------|-------|-------|

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.

Таблица 4

| Маркер       | Ген   | Результат эксперимента | Интерпретация результата эксперимента | Примечание                                                                                                                |
|--------------|-------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Plex1</b> |       |                        |                                       |                                                                                                                           |
| rs7412       | APOE  | G<br>A                 | C<br>T                                | Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте |
| rs429358     | APOE  | T<br>C                 | T<br>C                                |                                                                                                                           |
| rs6025       | FV    | C<br>T<br>A            | C<br>T<br>A                           |                                                                                                                           |
| rs11549465   | HIF1A | G<br>A                 | C<br>T                                | Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте |
| rs1801131    | MTHFR | A<br>C                 | T<br>G                                | Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте |
| <b>Plex2</b> |       |                        |                                       |                                                                                                                           |
| rs6050       | FI    | A<br>T<br>G            | T<br>A<br>C                           | Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте |
| rs1799963    | FII   | C<br>T                 | G<br>A                                | Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте |
| rs1799889    | PAI-I | T<br>C                 | A<br>G                                | Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте |
| rs2010963    | VEGF  | C<br>G<br>T            | C<br>G<br>T                           |                                                                                                                           |
| rs1801133    | MTHFR | C<br>T<br>G            | G<br>A<br>C                           | Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте |

Полиморфизмы генов ассоциированы с развитием атеросклероза, ишемической болезнью сердца, инфаркта миокарда и тромбоэмболией. 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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| rs7412   | APOE CYS112ARG | Сахарный диабет, метаболический синдром, ожирение, сердечно-сосудистая патология, инсульт, дисбеталипопротеинемия, гиперлипопротеинемия, ксантоматоз, болезнь Альцгеймера. | Т/Т для rs7412 и С/С для rs429358 (E3) – норма, не способствует повышению риска развития атеросклероза. С/С для rs7412 и С/С для rs429358 (E2) – значительно увеличивает риск развития такого редкого заболевания, как гиперлипопротеинемия, тип 3. Большинство людей с этим расстройством имеют две копии E2. Заболевание характеризуется повышенным уровнем в крови холестерина и триглицеридов. Т/Т для rs7412 и Т/Т для rs429358 (E4) - возрастает вероятность развития атеросклероза. Это заболевание, характеризующееся прогрессирующим сужением кровеносных сосудов за счет холестериновых бляшек, повышает риск ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и инсульта. |
| rs429358 | APOE ARG158CYS |                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| rs6050   | FI THR312ALA   | Венозные тромбозы.                                                                                                                                                         | С/С – риск нарушения нормальной работы последнего этапа коагуляционного каскада, риск венозных тромбозов.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|            |              |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| rs11549465 | HIF1A C1772T | Сердечно-сосудистые заболевания и ишемия.                                                                                                                                                                                            | Генотип Т/Т снижает экспрессию фактора, индуцируемого гипоксией (HIF1A), в результате чего происходит снижение продукции гена VEGF (ростового фактора эндотелия сосудов).                                                                              |
| rs6025     | FV ARG506GLN | Тромбоэмболия, тромбоз, преэклампсия, ишемический инсульт.                                                                                                                                                                           | С/С – генотип, не предрасполагающий к повышению свертывания крови.<br>С/Т – генотип, предрасполагающий к повышению свертывания крови, в гетерозиготной форме.<br>Т/Т – генотип, предрасполагающий к повышению свертывания крови, в гомозиготной форме. |
| rs1799963  | FII G20210A  | Тромбоз, тромбоэмболия, преэклампсия, ишемический инсульт.                                                                                                                                                                           | Г/Г – генотип, не предрасполагающий к повышению свертывания крови.<br>Г/А – генотип, предрасполагающий к повышению свертывания крови, в гетерозиготной форме.<br>А/А – генотип, предрасполагающий к повышению свертывания крови, в гомозиготной форме. |
| rs2010963  | VEGF G634C   | Сердечно-сосудистые заболевания.<br>Экспрессия VEGF стимулируется множеством проангиогенных факторов, включая эпидермальный ростовой фактор, основной фибробластный ростовой фактор, тромбоцитарный ростовой фактор и интерлейкин-1. | Г/Г — нормальный процесс ангиогенеза (роста кровеносных сосудов).<br>С/С и Г/С – риск нарушения нормального процесса ангиогенеза.                                                                                                                      |
| rs1801131  | MTHFR A1298C | Сердечно-сосудистые заболевания, ишемическая                                                                                                                                                                                         | Т/Т – нормальная активность работы                                                                                                                                                                                                                     |

|           |             |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                              |
|-----------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|           |             | болезнь сердца, ишемический инсульт, гипертония, атеросклероз, тромбозы, преэклампсия, гипергомоцистеинемия. | фермента.<br>T/G - снижение работы фермента MTHFR в комбинации с гетерозиготности аллелей 677A (rs1801133) и 1298G (rs1801131).<br>G/G - снижение работы фермента MTHFR                                      |
| rs1801133 | MTHFR C677T | Сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз, тромбозы.                                                     | G/G нормальная активность фермента MTHFR,<br>G/A снижение активности фермента MTHFR в комбинации с гетерозиготностью аллелей 677A (rs1801133) и 1298G (rs1801131).<br>A/A снижение активности фермента MTHFR |
| rs1799889 | PAI-I 4G/5G | Венозная тромбоэмболия.                                                                                      | 5G/5G (G/G) – нормальный уровень PAI-I в плазме крови.<br>5G/4G (G/A) – промежуточный уровень PAI-I в плазме крови.<br>4G/4G (A/A) – повышенный уровень PAI-I в плазме крови.                                |

#### 5.7 Анализ результатов минисеквенирования для контрольных образцов.

Контрольный образец в результате реакции минисеквенирования должен демонстрировать генотипы, указанные в паспорте к контрольному образцу.

В отрицательном контроле не должны визуализироваться целевые фрагменты ДНК.

### 6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

1. Набор должен храниться при температуре минус (12-18) °C 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.