

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

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
SNP6-TMG
«SNP6-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 «SNP6-TMG» предназначен для выявления десяти генетических маркеров, связанных с риском развития заболеваний тромбогенного характера методом минисеквенирования.

Перечень определяемых однонуклеотидных замен:

№ п/п	Номер мутации	Ген/Полиморфизм
1.	rs2066865	FGG/ G>A
2.	rs1613662	Gp6/ G>A
3.	rs2289252	F XI/ C>T
4.	rs2036914	F XI/ T>C
5.	rs3025039	VEGF/ C>T
6.	rs1654419	Gp6/ A>G
7.	rs1671153	Gp6/ G>T
8.	rs6046	F VII/ G>A, G>T, G>C
9.	rs1126643	ITGA2/ C>T
10.	rs5186	AGTR1/ A>C

Набор рассчитан на анализ **20 образцов ДНК**.

Продолжительность анализа по 10 маркерам 7 часов.

2. СОСТАВ НАБОРА РЕАКТИВОВ «SNP6-TMG»

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.

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. 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 объемом 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°C;
12. Холодильник, отрегулированный на температуру от плюс 2 до плюс 8°C
13. Транспортный контейнер со льдом;
14. Штативы для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл.
15. Дезинфицирующее средство «Полидез» или его аналоги;
16. Hi-Di™ Formamide («Thermo Fisher», США, кат.№ 4311320) или его аналоги;
17. GeneScan™ 120 LIZ™ Size Standard («Thermo Fisher», США, кат.№ 4322362);
18. POP4 полимер («Thermo Fisher», США, кат.№ 4393710);
19. Нуклеаза EhoI (“NEB”, США, кат.№ M0293S) или ее аналоги;
20. Фосфатаза rSAP (“NEB”, США, кат.№ M0371L) или ее аналоги;
21. Набор SNaPshot Multiplex Kit («Thermo Fisher», США, кат.№ 4323159);
22. Набор флуоресцентных красителей “Matrix Standard Set DS-02” («Thermo Fisher», США, кат.№ 4323014)
23. 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
- 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.

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 рlexAMP	5	
Раствор ДНК полимеразы	0,2	
ИТОГО:	24 мкл	

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 и «ПК» для положительного контролей, соответственно.

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 объем реакционной смеси в каждой пробирке составляет 25 мкл.

7. Поместить микропробирки в термоблок амплификатора. Закрыть 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
	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 *EcoI* 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 «S-1» до «S-N», «S-OK» для отрицательного контроля и «S-ПК» для положительного контроля, 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.

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.

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

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	

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

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

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 gSAP, 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 -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 9,25 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 95°C в течение 5 минут с последующим охлаждением до 10°C (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 РОР-4 и капилляры длиной 36см, также проведена спектральная калибровка с использованием набора флуоресцентных красителей «Matrix Standard Set DS-02». Все действия с прибором должны проводиться 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 длины фрагмента							
	A		G		C		T	
	от	до	от	до	от	до	от	до
rs 2066865					31,72	32,51	33,58	34,28
rs 1613662	39,43	40,02	37,46	37,88				
rs 2289252	44,63	45,18	43,37	44,07				
rs 2036914					46,70	47,34	47,60	48,3
rs 3025039	49,76	50,46	48,66	49,43				
rs 1654419					57,01	58,11	56,35	57,45
rs 1671153			57,86	58,66			59,13	59,86
rs 6046	61,88	62,45	60,85	61,53	60,58	61,58	61,38	62,0
rs 1126643					67,04	67,52	67,78	68,33
rs 5186	70,89	71,49			70,19	70,69		

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 2066865	FGG	C T	G A	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs 1613662	Gp6	G A	G A	-
rs 2289252	F XI	G A	C T	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте

rs 2036914	F XI	T C	T C	-
rs 3025039	VEGF	G A	C T	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs 1654419	Gp6	T C	A G	Для данного маркера при интерпретации результата следует записывать нуклеотид, комплементарный полученному в эксперименте
rs 1671153	Gp6	G T	G T	-
rs 6046	F VII	G A C T	G A C T	-
rs 1126643	ITGA2	C T	C T	-
rs 5186	AGTR1	A C	A C	-

Полиморфизмы генов ассоциированы с предрасположенностью к развитию ряда заболеваний тромбогенного характера. 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
rs2066865	FGG/ G>A	Афибриногенемия	Фактор риска - присутствие аллеля А
rs1613662	Gp6/ G>A	Ранний инфаркт миокарда, венозная тромбоэмболия	Присутствие аллеля G ассоциировано с риском раннего инфаркта миокарда и венозной тромбоэмболии
rs2289252	F XI/ C>T	Венозная тромбоэмболия	Генотипы C/T и T/T ассоциированы с риском развития венозной тромбоэмболии
rs2036914	F XI/ T>C	Тромбоз глубоких вен	C/T и C/C – риск нарушения ингибирования фибринолиза, риск венозного тромбоза
rs3025039	VEGF/ C>T	Ишемическая болезнь сердца	T/T – потенциальный генетический маркер риска развития ИБС.
rs1654419	Gp6/ A>G	Венозные тромбозы	G/G - адекватная активация, адгезия и агрегация тромбоцитов. A/A и A/G - потенциальное взаимодействие тромбоцитов с

			коллагеном через рецептор GP6 приводит к активации и адгезии тромбоцитов и образованию тромбов
rs1671153	Gp6/ G>T	Тромбоз глубоких вен, тромбоэмболия легочных артерий	Т/Т - адекватная активация, адгезия и агрегация тромбоцитов. G/T, G/G – риск гиперагрегируемости тромбоцитов, взаимодействие тромбоцитов с коллагеном с образованием тромбов
rs6046	F VII/ G>A, G>T, G>C	Кровотечение на фоне антикоагулянтной терапии, тяжёлое течение гемофилии	Присутствие аллеля А ассоциировано со снижением риска инфаркта миокарда, понижением кровяного давления и сниженным уровнем содержания факторов FVIIa _g , FVIIc и FVIIa _v в плазме крови, что снижает риск тромбообразования, но повышает риск кровотечения
rs1126643	ITGA2/ C>T	Повышение вероятности кровотечения	Аллель Т ассоциирован со снижением среднего уровня тромбоцитов
rs5186	AGTR1/ A>C	Атеросклероз, гипертония	А/С и С/С – повышенная чувствительность рецепторов 1 типа к нормальному уровню ангиотензин превращающего фермента АТ-II, риск высокого артериального давления

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) °С 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.