«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
однонуклеотидных полиморфизмов C825T гена *GNB3* и G1675A гена *AGTR2*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика GNB3 C825T/AGTR2 G1675A»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов C825T гена *GNB3* и G1675A гена *AGTR2* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика GNB3 C825T/AGTR2 G1675A» предназначен для определения однонуклеотидных полиморфизмов C825T гена бета 3 субъединицы G-белка *GNB3* и G1675A гена рецептора типа 2 ангиотензина II *AGTR2*, ассоциированных с риском развития артериальной гипертензии, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Результаты генотипирования, полученные с использованием данного набора реагентов, могут быть использованы лечащим врачом в комплексной оценке риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (степень генетической предрасположенности к развитию артериальной гипертензии).

Выделение ДНК из клинического материала (буккального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор применяется с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Гибридизационный ДНК-зонд для детекции полиморфизма C825T комплементарен мутантной последовательности гена *GNB3*; гибридизационный ДНК-зонд для детекции полиморфизма G1675A комплементарен мутантной последовательности гена *AGTR2*. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип («нормальная гомозигота», «гетерозигота», «мутантная гомозигота»).

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

– контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;

– контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;

– элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

– оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения полиморфизмов C825T гена *GNB3* и G1675A гена *AGTR2* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП ДНК Гипертония (рег. № 05-2-654).

Специфичность составляет 100% при условии, что генотип по полиморфизмам C825T гена *GNB3* и G1675A гена *AGTR2* в образцах № 1-4 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствую-

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

щего генотипу «Нормальная гомозигота».

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота».

3.4. Диагностическая специфичность определения полиморфизмов составила:

- диагностическая специфичность определения полиморфизма С825Т гена бета 3 субъединицы G-белка GNB3: клинические испытания, проведенные на 225 образцах от 205 пациентов, показали 100% специфичность (интервал 98,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность определения полиморфизма G1675A гена рецептора типа 2 ангиотензина II AGTR2*:* клинические испытания, проведенные на 225 образцах от 205 пациентов, показали 100% специфичность (интервал 98,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп

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

в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США);

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные с истемы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер для пробирок вместимостью 0,2 мл, обеспечивающий перемешивание при 1200 об/мин (например, PSU-2T, фирма «BioSan», Латвия);

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);

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

– нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (буккального эпителия, цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию набора для выделения).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая

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

плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору, пп. 7.6. - 7.9. и Приложением 2 к данной инструкции.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 минута.

7.7. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации генетических полиморфизмов:

«FAM» – регистрация C825T гена *GNB3*;

«ROX» – регистрация G1675A гена *AGTR2*.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

8.1.1. Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

8.1.2. Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

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

8.2. Анализ результатов определения полиморфизмов C825T гена *GNB3* и G1675A гена *AGTR2*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение температуры отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение температуры отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение температуры одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2 (подробнее см. в Приложении 1 и Приложении 2 к данной инструкции).

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире. Риск развития сердечно-сосудистых заболеваний складывается из совокупности множества факторов, как внешних (образ жизни, питание, стрессы, экология, перенесённые ранее заболевания), так и связанных с генетической предрасположенностью конкретного индивида. Вклад наследственности в развитие гипертонической болезни оценивается в 40-65%. Роль генетических факторов показана в развитии преэклампсии, риск инфарктов и инсультов также зависит от генетической предрасположенности. Для каждой из патологий невозможно выделить единственный ответственный ген, необходимо рассматривать влияние совокупности различных полиморфизмов в ряде генов.

GNB3 (бета 3 субъединица G-белка). Гетеротримерные GTP-связывающие белки (G-белки) играют важную роль во множестве физиологических процессов, включая передачу нервного импульса, метаболизм, регуляцию сердечно-сосудистой системы, миграцию лимфоцитов. Замена C825T приводит к альтернативному сплайсингу, делеции 41 аминокислоты

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

и синтезу укороченного варианта белка. При этом функциональная активность укороченного белка выше, чем у нормального, что приводит к усилению трансмембранной передачи сигналов. Согласно исследованиям, носители аллеля 825T имеют повышенный риск развития артериальной гипертензии, гипертрофии левого желудочка и ряда других заболеваний, включая ожирение, диабет, депрессию и образование опухолей.

AGTR2 (Рецептор типа 2 ангиотензина II). Рецептор AGTR2 активно экспрессируется только во время эмбрионального развития, во время постнатального развития экспрессия AGTR2 значительно снижена. Активация AGTR2 приводит к вазоконстрикции, остановке клеточного цикла и апоптозу. AGTR2 является основным регулятором синтеза альдостерона. Наиболее значимый полиморфизм G1675A затрагивает первый интрон гена и приводит в результате альтернативного сплайсинга к повышенной чувствительности рецептора к ангиотензину II, что проявляется его основными кардиоваскулярными эффектами и реализуется в патогенезе артериальной гипертензии и её осложнений.

Более подробно ознакомиться с диагностической значимостью определения однонуклеотидных полиморфизмов C825T гена *GNB3* и G1675A гена *AGTR2* можно в литературе:

Карпов Р.С., Пузырев К.В., Кошельская О.А. и др. Полиморфные маркеры генов GNB3 (C825T), AGTR1 (A1166C) и ACE (A2350G и I/D) у больных артериальной гипертонией, сочетающейся с сахарным диабетом типа 2 // Терапевтический архив, 2004, № 6, С. 30-35.

Никитин А.Г., Чудакова Д.А., Спицина Е.В. и др. Ассоциация полиморфного маркера C825T гена GNB3 с ишемической болезнью сердца // Генетика, 2007, Т. 43, № 8, С. 1129-1133.

Рябов Г.С., Казеннова Е.В., Бобков А.Ф. Аллель гена субъединицы ß3 G-белка (GNB3), ассоциированный с гипертонией, нарушениями липидного обмена и диабетом второго типа: частота встречаемости в России // Медицинская генетика, 2002, № 2, С. 95-96.

Пузырев В.П., Карпов Р.С. Генетика артериальной гипертонии. Руководство по артериальной гипертонии / Под ред. Чазова Е.И., Чазовой И.Е. М.: МедиаМедика, 2005, 784 с.

Guo L., Zhang L.L., Zheng B. et al. The C825T polymorphism of the G-protein β3 subunit gene and its association with hypertension and stroke: an updated meta-analysis // PLoS ONE, 2013, V. 8, I. 6, P. e65863.

Nejatizadeh A., Kumar R., Stobdan T. et al. Association of GNB3 C825T polymorphism with plasma electrolyte balance and susceptibility to hypertension // Genet Mol Biol., 2011, V. 34, N. 4, P. 553-6.

Rosskopf D., Busch S., Manthey I., Siffert W. G protein beta 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms // Hypertension, 2000, V. 36, N. 1, P. 33-41.

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

Siffert W. G protein beta 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy // Nephrol Dial Transplant., 2000, V. 15, N. 9, P. 1298-306.

Siffert W. G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes // Annu Rev Med., 2005, V. 56, P. 17-28.

Zhang Y., Zhang K.X., Wang G.L. et al. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphisms and essential hypertension. // Acta Pharmacol Sin., 2003, V. 24, N. 11, P. 1089-93.

Zhang M., Ma H., Wang B.S., Zhao Y.Z. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphisms and cardioprotective role in essential hypertension // Heart Vessels, 2006, V. 21, P. 95-101.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика GNB3 C825T/AGTR2 G1675A», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

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

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211, тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Ген	Полиморфизм	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	**«Мутантная гомозигота»**	**«Гетерозигота»**
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °С от КО1 и КО2
GNB3	С825Т	«FAM»	С/С	Т/Т	С/Т
AGTR2	G1675A	«ROX»	G/G	A/A	G/A

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Работа с детектирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США).

Примечание. Для иллюстрации в настоящей инструкции использованы скриншоты программы Bio-Rad CFX Manager v3.0. Для других версий ПО внешний вид может незначительно отличаться от приведённого ниже.

А. Запуск реакции

1) Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления (закладка «Protocol»):

– Установить объём образца – 50 мкл («Sample Volume 50 µl»)

– 1 шаг: 50°C – 2 минуты;

– 2 шаг: 95°C – 2 минуты;

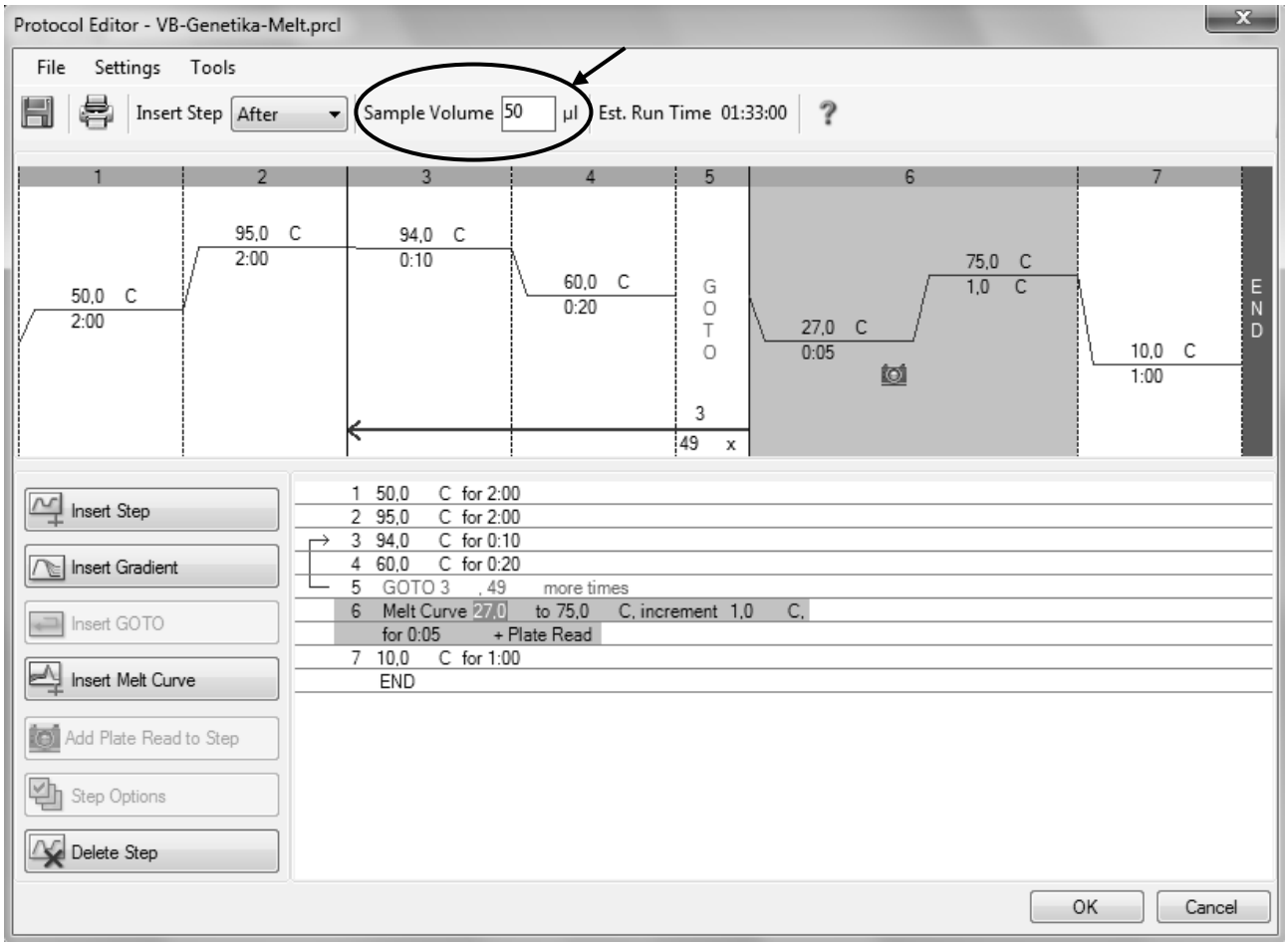
– 3 шаг: 94°C – 10 секунд;

– 4 шаг: 60°C – 20 секунд;

– 5 шаг: повтор («Insert GOTO»), начиная с шага 3, ещё 49 раз – суммарно 50 циклов;

– 6 шаг: «кривая плавления» («Insert Melt Curve») от 27 °C до 75 °C с увеличением на 1°C; инкубация на каждой температуре в течение 5 секунд с измерением флуоресценции;

— 7 шаг: 10°C – 1 минута.



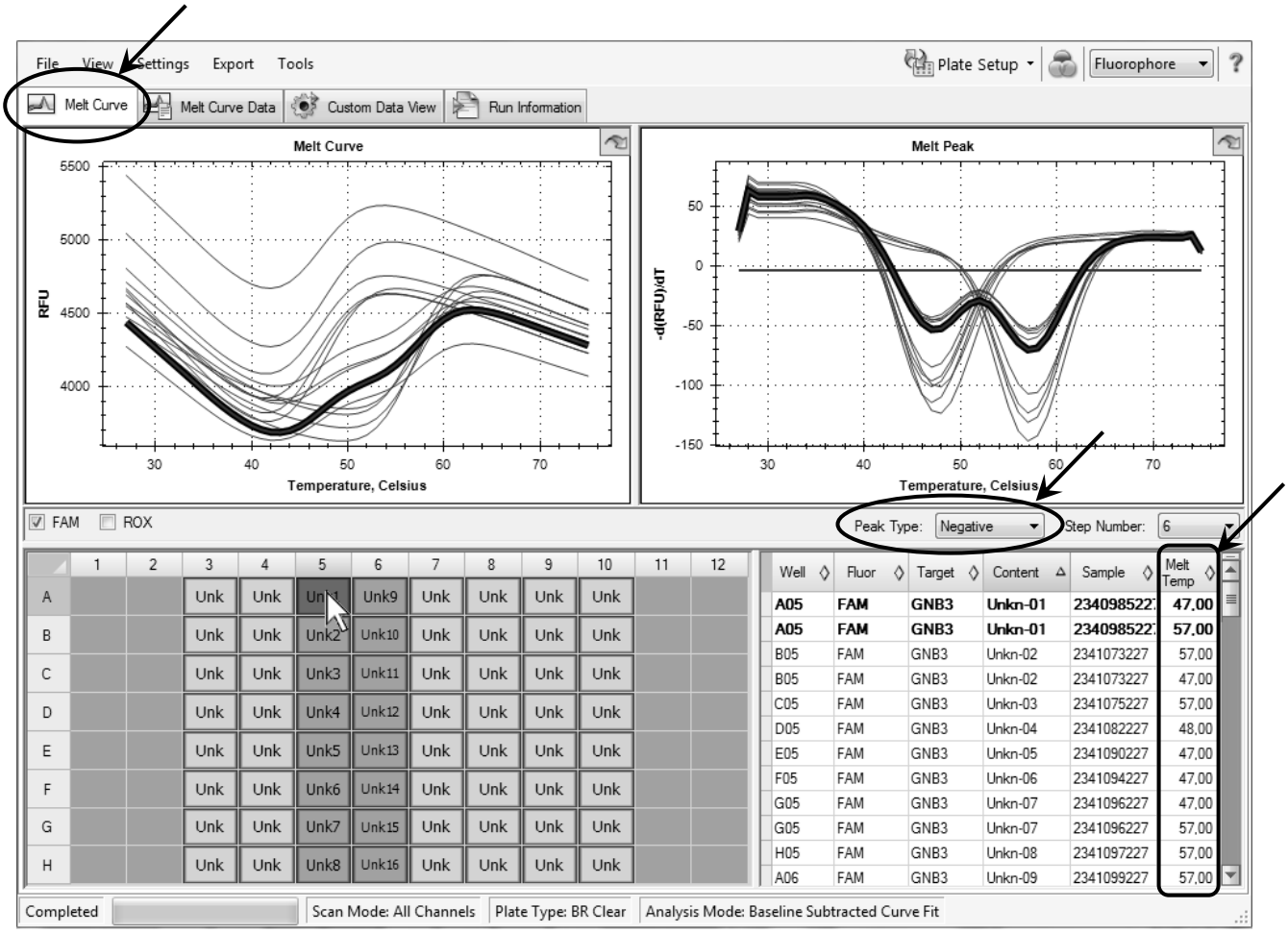
Внимание! *Измерение флуоресценции на шаге 4 в данном протоколе не проводится!*

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

2) Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами (закладка «Plate»). Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации генетических полиморфизмов: «FAM», «HEX», «ROX».

3) Запустить программу (закладка и кнопка «Start Run») и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

В. Регистрация и учёт результатов



Для просмотра результатов анализа после окончания реакции следует выбрать вверху закладку «**Melt Curve**» . На графике слева отображаются исходные данные измерения интенсивности флуоресценции в зависимости от температуры, этот же график отображается в реальном времени во время реакции. На графике справа представлены обработанные кривые, имеющие вид пиков плавления. В меню под графиком надо выбрать тип пиков: отрицательные . В таблице справа внизу отображаются значения температур плавления для выделенных образцов. Образец, на который наведён курсор, подсвечивается жирным в таблице и на графиках.

Для КО1 и КО2 в соответствующих каналах детекции должно фиксироваться по одному пику плавления. Возможны два варианта расположения пиков плавления КО1 и КО2:

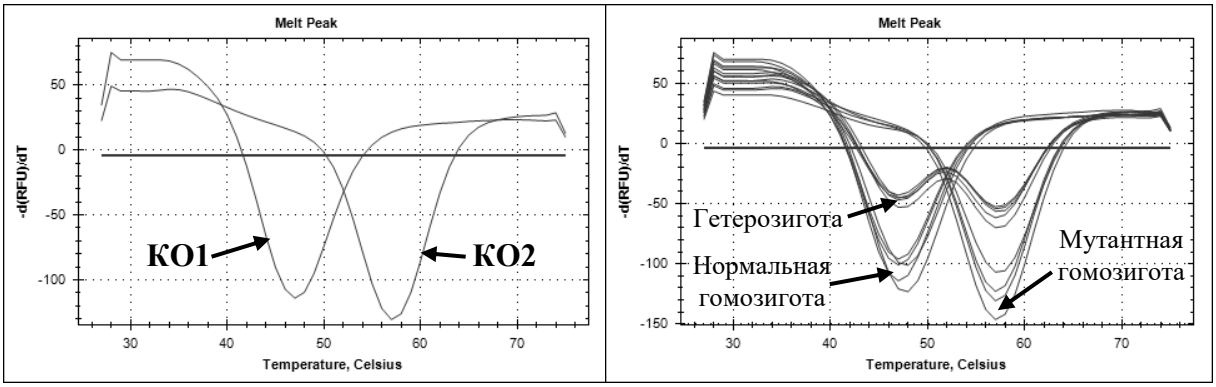
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1) КО2 может иметь более высокую температуру плавления, чем КО1;

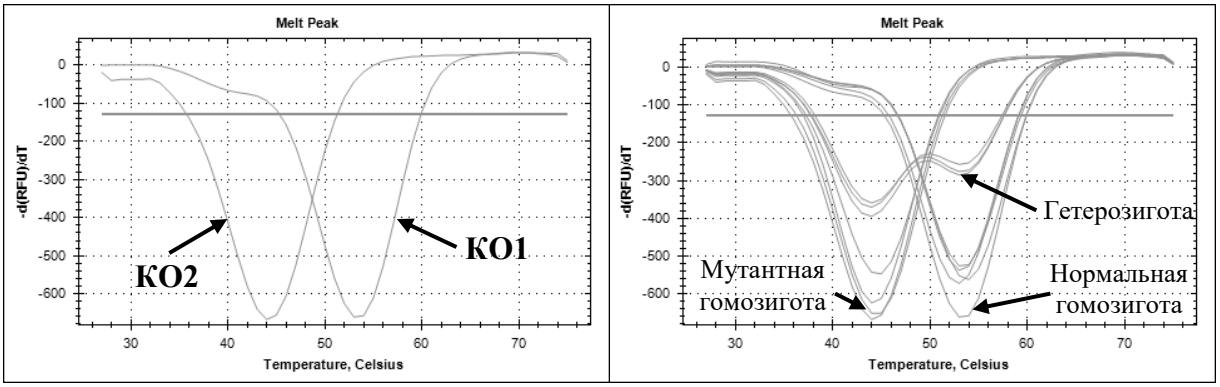
2) КО1 может иметь более высокую температуру плавления, чем КО2.

Точная информация о значении температур плавления для КО1 и КО2 для конкретного набора реагентов приведена в пп. 3.2. и 3.3. Инструкции по применению этого набора.

Вариант 1. Определение генотипа образца (КО2 имеет более высокую температуру плавления, чем КО1).



Вариант 2. Определение генотипа образца (КО1 имеет более высокую температуру плавления, чем КО2).



Для каждого исследуемого образца в соответствующих каналах детекции (см. Приложение 1) должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

Генотип анализируемого образца учитывается как **«Нормальная гомозигота»**, если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1.

Генотип анализируемого образца учитывается как **«Мутантная гомозигота»**, если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

Генотип анализируемого образца учитывается как **«Гетерозигота»**, если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

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