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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения однонуклеотидного полиморфизма -13910C/T гена MCM6 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика MCM6»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для определения однонуклеотидного полиморфизма -13910C/T гена MCM6 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления (РеалБест-Генетика MCM6)» предназначен для определения однонуклеотидного полиморфизма -13910C/T гена *MCM6 (регуляторная область гена LCT, кодирующего фермент лактазу)* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой и анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала проводится с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для примен ения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма Bio-Rad, США).

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

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-полимеразой.

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

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. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип по каждому из определяемых полиморфизмов.

Генотип «С/С» повышает риск непереносимости лактозы и развития остеопороза.

Генотип «С/Т» ассоциирован с вариабельным уровнем лактазной активности и повышает риск развития вторичной лактазной недостаточности.

Генотип «Т/Т» повышает вероятность хорошей переносимости лактозы.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

– контрольный образец «Гомозигота С/С» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;

– контрольный образец «Гомозигота Т/Т» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;

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

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

Принадлежности:

– оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения однонуклеотидного полиморфизма -13910С/Т гена *MCM6* человека определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2-566), как процентное содержание правильно определенных генотипов в образцах №1 и №2 СОП ДНК MCM6 и составляет 100%.

3.2. Контрольный образец КО1 должен определяться как генотип «Гомозигота С/С» по полиморфизму -13910С/Т.

3.3. Контрольный образец КО2 должен определяться как генотип «Гомозигота Т/Т» по полиморфизму -13910С/Т.

3.4. Диагностическая специфичность определения однонуклеотидного полиморфизма -13910С/Т гена *MCM6*: клинические испытания, проведенные на 211 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

<u>Внимание!</u> Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (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, исследующих 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 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».

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

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

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

– мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);

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

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

– термошейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 1300 об/мин и при температуре 65 оС (Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N, фирма «BioSan», Латвия)

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

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

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

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

– отсасыватель медицинский В-40 (фирма «Висма-Планар», Беларусь);

– одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл (фирма «SSI», США, кат. № 2340);

– магнитный штатив для пробирок (фирма ЗАО «Вектор-Бест», Россия);

– нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Внимание! Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО).

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

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора. КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (см. инструкцию набора для выделения).

Внимание! Элюцию ДНК проводить с использованием 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», который является компонентом данного набора. Тщательно перемешать с помощью встряхивателя для пробирок. Центрифугировать в микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту.

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.

ГРС после первого вскрытия упаковки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

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 (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

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

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

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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.

7.6. Выбрать канал «FAM» для детекции кривых плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидного полиморфизма -13910C/T.

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

7.8. 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.

Для КО1 в канале детекции «FAM» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Гомозигота С/С» (непереносимость лактозы), и определяться значение температуры плавления. КО1 должен определяться как генотип «Гомозигота С/С» по полиморфизму -13910C/T.

Для КО2 в канале детекции «FAM» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Гомозигота Т/Т» (переносимость лактозы), и определяться значение температуры плавления. КО2 должен определяться как генотип «Гомозигота Т/Т» по полиморфизму -13910C/T.

Внимание! Температуры плавления продуктов гибридизации могут отличаться не более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и КО2.

8.2. Анализ результатов определения однонуклеотидного полиморфизма -13910C/T гена MCM6.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в канале детекции «FAM» должны фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться их температуры.

8.2.2. Для каждого образца определить генотип по полиморфизму -13910C > T в соответствии с полученными температурами пиков плавления для КО1 и КО2 или с применением сервисной компьютерной программы «РеалБест-Генетика» (которая проводит все операции

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

по отбраковке и анализу образцов и приводит результаты в виде таблицы с генотипами в анализируемых пробах).

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и 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 определения однонуклеотидного полиморфизма -13910C/T гена *MCM6* описана в литературе:

Enattah N.S., Sahi T., Savilahti E., Terwilliger J.D., Peltonen L., Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia // Nature Genetics, 2002, V. 30, P. 233-237.

Olds L.C., Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element // Human Molecular Genetics, 2003, V. 12, N. 18, P. 2333-2340.

Hogenauer C., Hammer H.F., Mellitzer K., Renner W., Krejs G.J., Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence // European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2005, V. 17, P. 371–376.

Mattar R., de Campos Mazo D.F., Carrilho F.J. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. // Clinical and Experimental Gastroenterology, 2012, V. 5, P. 113–121.

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.

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

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 МСМ6», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

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