



Инструкция по применению набора реагентов расположена на сайте www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® MTHFR-SNP-FL

Форма 1: **REF** S-3721-1

Форма 2: **REF** S-3722-1-4



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123, город
Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



VER 31.03.20

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

– «РИБО-преп» и другие комплекты, рекомендованные Изготовителем.

Контроли: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контроля и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:	
Исследуемый образец	осадок, полученный после предобработки гемолитиком 100 мкл цельной венозной крови (порядок подготовки исследуемого материала см. в инструкции)
ОКО	100 мкл в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
Элюция	
Все образцы	50 мкл в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов три положительных контроля ПЦР (K1+, K2+ и K3+), отрицательный контроль ПЦР (K-), отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-FL MTHFR, ПЦР-буфером-С и полимеразой (TaqF).
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL MTHFR	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	5*(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5*(N+K+1)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных образцов.

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов и разведенных до концентрации 10-30 нг в реакцию	в пробирки для исследуемых образцов
K+ ДНК 1	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K1+)
K+ ДНК 2	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K2+)
K+ ДНК 3	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K3+)
K-	в пробирку для отрицательного контроля ПЦР (K-)
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для отрицательного контроля экстракции (ОК)

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (25 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов три положительных контроля ПЦР (K1+, K2+ и K3+), отрицательный контроль ПЦР (K-), отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью MTHFR-Lyo** для амплификации исследуемых и контрольных образцов.

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов и разведенных до концентрации 10-30 нг в реакцию	в пробирку для исследуемых образцов
10 мкл K+ ДНК 1 и 15 мкл K-	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K1+)
10 мкл K+ ДНК 2 и 15 мкл K-	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K2+)
10 мкл K+ ДНК 3 и 15 мкл K-	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K3+)
K-	в пробирку для отрицательного контроля ПЦР (K-)
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для отрицательного контроля экстракции (ОК)

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализ результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Ген	rs	Канал для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
MTHFR	rs1801133	аллель С	аллель Т	–	–
	rs1801131	–	–	аллель А	аллель С

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки, особенности установки пороговой линии и граничные значения C_t для приборов роторного и планшетного типа, необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Принципы интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.