

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 22.07.2011г. № 4482-17п/11

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека



В.И.Покровский

« 11 » 03 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления генетических полиморфизмов в генах
GSTT1 и *GSTM1* человека методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией
продуктов амплификации в агарозном геле

«АмплиСенс® *GSTT1 / GSTM1-EPh*»

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	5
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	6
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	6
СОСТАВ.....	8
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	8
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	8
А. Подготовка пробирок для амплификации	9
Б. Проведение амплификации.....	9
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ.....	10
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	10
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	13

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ОКО	- отрицательный контрольный образец выделения
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
EPh	- электрофоретическая детекция

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *GSTT1* / *GSTM1*-EPh» предназначен для выявления делеционных полиморфизмов в генах глутатион-S-трансфераз *GSTT1* и *GSTM1* человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Данный набор реагентов позволяет обнаруживать гомозиготные варианты по делециям в генах *GSTT1* и *GSTM1*.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из образцов периферической крови. Для экстракции ДНК и электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление делеционных полиморфизмов в генах *GSTT1* и *GSTM1* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией включает в себя три этапа: экстракция (выделение) ДНК из образцов клинического материала, ПЦР-амплификация участков генов *GSTT1* и *GSTM1* человека, и электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле. С пробамы выделенной ДНК проводится реакция амплификации фрагментов генов *GSTT1* и *GSTM1*, содержащих делеционные полиморфизмы, при помощи специфических праймеров и фермента Taq-полимеразы. В качестве внутреннего контроля используется ген альбумина (после амплификации фрагмент присутствует всегда).

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

Определение размеров амплифицированных фрагментов осуществляется после окончания ПЦР с помощью электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,5 мл),

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,2 мл).

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации участков генов *GSTT1* и *GSTM1* человека. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК и электрофоретической детекции продуктов амплификации, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным.

Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы (включая буфер и гели) следует удалять в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
3. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ» (ТУ 9398-070-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

4. Дополнительные материалы и оборудование для электрофоретической детекции – согласно инструкции к комплекту реагентов для электрофоретической детекции.
5. Гемолитик (ТУ 9398-097-01897593-2010).
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
7. Центрифуга/вортекс.
8. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 и от 20 до 200 мкл).
9. Одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл и 200 мкл в штативах.
10. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Термостат для пробирок типа Эппендорф от 25 до 100 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Емкость для сброса наконечников.
15. Программируемый амплификатор. Например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичный для пробирок 0,5 мл; Gradient Palm Cyclor, (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США) или аналогичный для пробирок 0,2 мл.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служит цельная периферическая кровь.

Взятие цельной периферической крови проводится в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают для равномерного перемешивания с ЭДТА.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

В случае использования комплектов реагентов «РИБО-преп» и «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

для экстракции РНК/ДНК необходимо провести пробоподготовку с помощью реагента «Гемолитик» (производство ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). В пробирку объемом 1,5 мл типа Эппендорф внести отдельным наконечником 1,0 мл гемолитика и 0,25 мл цельной крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком.

Полученный осадок лейкоцитов должен быть использован для экстракции ДНК (при работе с комплектом реагентов «РИБО-преп», добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R – комплект реагентов для амплификации фрагментов генов *GSTT1* и *GSTM1* – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-R <i>GSTT1</i> / <i>GSTM1</i> / <i>ALB</i>² раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,005	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2 red	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации.
- Электрофоретическая детекция продуктов амплификации и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию ДНК из клеток периферической крови проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту для выделения РНК/ДНК («ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Оптимальная концентрация ДНК для проведения ПЦР составляет 1-3 нг/мкл (10-30 нг ДНК на ПЦР-реакцию).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

² Ген альбумина (*ALB*) используется в качестве внутреннего контроля.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-R *GSTT1 / GSTM1 / ALB*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. В пробирки с **ПЦР-смесью-1-R *GSTT1 / GSTM1 / ALB*** на поверхность застывшего воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2 red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с содержимым пробирки под воском.
3. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР**.
4. Используя наконечники с фильтрами, в подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
5. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**;
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК человека**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования (см. табл. 1).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 1

Программа амплификации ДНК

цикл	GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) Gradient Palm Cyclor (Corbett Research) MaxyGene (Axygen)		
	температура, °С	время	циклы	температура, °С	время	циклы
0	95	пауза		95	пауза	
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	10 с	45	95	15 с	45
	60	10 с		60	15 с	
	72	15 с		72	20 с	
3	72	2 мин	1	72	2 мин	1
4	4	хранение		4	хранение	

3. После окончания реакции собрать пробирки в штатив и отправить в помещение для детекции продуктов амплификации (ЗОНУ 3).

Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С (однако, перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекцию провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации («ЭФ» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Разделение фрагментов рекомендуется проводить в агарозном геле толщиной около 0,6 см, концентрацией агарозы 1,7 %, расстоянием между гребенками не менее 6 см. Количество продукта амплификации, вносимого в лунку – 5 мкл. В **каждом** ряду дорожек геля должен обязательно присутствовать **положительный контроль ПЦР (К+)** и **маркер молекулярных масс ДНК**. Оптимальная напряженность электрического поля составляет 10 В/см. Продолжительность электрофореза должна быть достаточной для четкого разделения всех трех амплифицируемых фрагментов.

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельном помещении сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в ЗОНЕ 1 и ЗОНЕ 2.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов ПЦР-исследования проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:

GSTT1 – 459 п.н.

GSTM1 – 219 п.н.

ALB – 350 п.н.

Результаты анализа полиморфизма в генах ***GSTT1*** и ***GSTM1*** (см. рис.1)

1. Отсутствие в дорожке полосы 459 п.н. при наличии полосы 350 п.н. – **делеция в гене *GSTT1* в гомозиготном состоянии** (см. рис. 1; образцы 9, 10).
 2. Наличие в дорожке полосы 459 п.н. при наличии полосы 350 п.н. – **не обнаружено делеции в гене *GSTT1* в гомозиготном состоянии** (см. рис. 1; образцы 1-8).
 3. Отсутствие в дорожке полосы 219 п.н. при наличии полосы 350 п.н. – **делеция в гене *GSTM1* в гомозиготном состоянии** (см. рис. 1; образцы 5-9).
 4. Наличие в дорожке полосы 219 п.н. при наличии полосы 350 п.н. – **не обнаружено делеции в гене *GSTM1* в гомозиготном состоянии** (см. рис. 1; образцы 1-4, 10).
 5. **В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (К+), должны быть три полосы на уровне 459, 350 и 219 п.н.** (см. рис. 1; образец 12).
 6. **Полоса 350 п.н.** должна быть во всех пробах, содержащих ДНК человека.
 7. **В дорожках, соответствующих отрицательному контролю экстракции (ОК) и отрицательному контролю этапа ПЦР (К-), не должно быть никаких полос** (см. рис.1, образцы 11, 13).
- Кроме полос **459, 350 и 219 п.н.** в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль*	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Специфическая полоса на электрофореграмме		
		219 п.н.	350 п.н.	459 п.н.
ОК	Экстракция РНК/ДНК	Нет	Нет	Нет
К–	ПЦР	Нет	Нет	Нет
К+	ПЦР	Есть	Есть	Есть

* См. рис. 1, образцы 11, 13, 12, соответствующие контролям ОК, К–, К+.

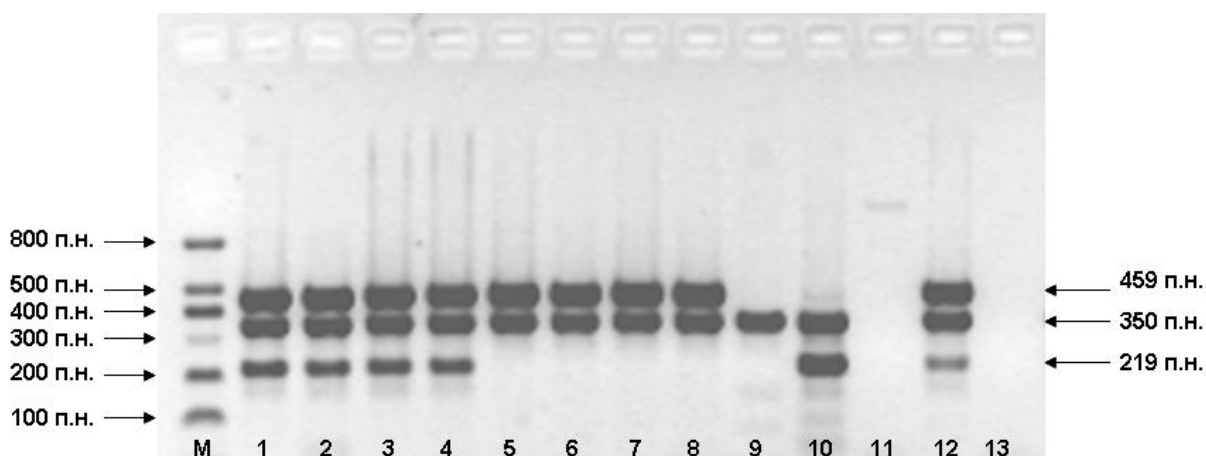
ВНИМАНИЕ!

1. Если в дорожке какого-либо из клинических образцов, при прохождении положительного контроля амплификации,

отсутствует полоса 350 п.н., необходимо повторить исследование этого клинического образца с первого этапа анализа (экстракция ДНК). Возможные причины: ошибка в процедуре обработки клинического материала, приведшая к потере ДНК, или ингибирование ПЦР.

2. Если в дорожке какого-либо из образцов отсутствуют полосы 350, 459 и 219 п.н., и присутствуют неспецифические полосы на разных уровнях, результат анализа по данному образцу считается недействительным. Необходимо повторить исследование этого клинического образца со второго этапа анализа (амплификация). Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
3. Появление хотя бы одной из полос 350, 459 и 219 п.н. в отрицательном контроле ПЦР (К-) и/или отрицательном контроле экстракции ДНК (ОК) указывает на контаминацию реактивов или проб. Требуется повторить анализ проб с первого этапа анализа (экстракция ДНК), а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Рисунок 1 – Примеры результатов анализа полиморфизма в генах *GSTT1* и *GSTM1*.



Обозначения: 1, 2, 3, 4 – делеций в генах *GSTT1* и *GSTM1* в гомозиготном состоянии не обнаружено; 5, 6, 7, 8 – делеция в гене *GSTM1* в гомозиготном состоянии; 9 – делеции в генах *GSTT1* и *GSTM1* в гомозиготном состоянии; 10 – делеция в гене *GSTT1* в гомозиготном состоянии; 11 – отрицательный контроль экстракции; 12 – положительный контроль; 13 – отрицательный контроль ПЦР; М – маркер молекулярных масс.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® **GSTT1** / **GSTM1-EPh**» направлять на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)³.

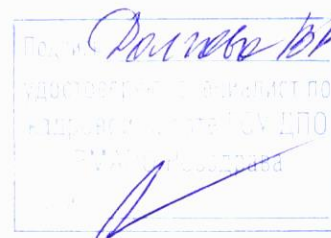
Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»



д.м.н. В.В.Долгов



³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.