

РУКОВОДСТВО
По применению диагностических наборов для выявления
полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР
«SNP-ЭКСПРЕСС»
производства НПФ «ЛИТЕХ»

Оглавление

«SNP-ЭКСПРЕСС-PB» – принцип метода	2
Диагностические наборы для определения полиморфизмов в геноме человека с детекцией в режиме реального времени	2
Требования к помещениям и организации работ	7
Необходимое оборудование и расходные материалы	7
Пробоподготовка	7
Методика проведения исследования	10
Руководство по применению на приборе CFX96 (BioRad)	10
Условия хранения и транспортировки реагентов	18
Алфавитный список генов (по их символам)	19
Создание комплектов для анализа полиморфизмов на заказ	22

«SNP-экспресс-PB»

ПРИНЦИП МЕТОДА

Система «SNP-экспресс-PB» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека.

Аналізу подвергается геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». Возможны альтернативные методы выделения, однако надёжный результат в этом случае не гарантирован.

С образцом выделенной ДНК параллельно проводятся две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. В смеси присутствует интеркалирующий краситель SYBR Green, флуоресценция которого многократно возрастает при встраивании в образующийся двуцепочечный продукт. Результаты анализа позволяют дать

три типа заключений: гомозигота по аллели 1; гетерозигота; гомозигота по аллели 2.

СОСТАВ НАБОРА реагентов «SNP-экспресс- PB»

Комплект реагентов для амплификации (на 50/100 образцов): хранить при -20°C (для разбавителя и минерального масла допускается хранение при +4°C), краситель SYBR Green хранить только при +4°C.

Внимание! Краситель SYBR Green разрушается под действием яркого света и хранится в коричневых непрозрачных пробирках. Перемещать его в прозрачные пробирки строго не рекомендуется!

	Комплект на 50 исследований + 10 контрольных образцов	Комплект на 100 исследований + 20 контрольных образцов
Положительный контрольный образец	60 мкл	120 мкл
Краситель SYBR Green	25 мкл	55 мкл
Реакционная смесь АЛЛЕЛЬ 1*	150 мкл	300 мкл
Реакционная смесь АЛЛЕЛЬ 2*	150 мкл	300 мкл
Разбавитель	2 мл	4 мл
Taq-полимераза	25 мкл	50 мкл
Минеральное масло	2 мл	4 мл

* - НАЗВАНИЕ 10х РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

АЛЛЕЛЬ 1 – аллель, указанная до позиции замены/делеции/инсерции.

АЛЛЕЛЬ 2 – аллель, указанная после позиции замены/делеции/инсерции.

Пример:

Генотип Ляйден (коагуляционный фактор V) F5 Arg506Gln

АЛЛЕЛЬ 1 – Arg

АЛЛЕЛЬ 2 – Gln

Мутация -1 BRCA1 BRCA1 185delAG

АЛЛЕЛЬ 1 – insAG

АЛЛЕЛЬ 2 - delAG

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ НАБОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА

Кат №	наименование	Кол-во образцов
02100	"ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь" (60 мл) Реагент для выделения ДНК из лейкоцитов цельной крови	100

Кат.№	НАИМЕНОВАНИЕ	ГЕН	Полиморфизм	Кол-во тестов
Системы свёртывания крови и фибринолиза				
s01101-50	Лейденская мутация (коагуляционный фактор V)	F5	Arg506Gln (LEIDEN)	60
s01101-100				120
s01102-50	Мутация протромбина (коагуляционный фактор II)	F 2	20210 G/A	60
s01102-100				120
s01103-50	Мутация 1 метилентетрагидрофолатредуктазы	MTHFR	Ala222Val (C677T)	60
s01103-100				120
s01124-50	Мутация редуктазы метионинсинтазы	MTRR	Ile22Met (66 a-g)	60
s01124-100				120
s01143-50	Мутация метионинсинтазы	MTR	Asp919Gly	60
s01143-100				120
s01106-50	Мутация интегринa, бета-3 (тромбоцитарный рецептор фибриногена)	ITGB3	Leu33Pro	60
s01106-100				120
s01155-50	Мутация-1 интегринa альфа-2 (GP1a, тромбоцитарный рецептор коллагена)	ITGA2	C807T	60
s01155-100				120
s01107-50	Мутация фибриногена, бета	FGB	-455G-A	60
s01107-100				120
s01120-50	Мутация ингибитора активатора плазминогена SERPINE (PAI) 1	SERPINE (PAI) 1	-675 5G/4G	60
s01120-100				120
s01181-50	Мутация эндотелина 1	EDN1	Lys198Asn	60
s01181-100				120
s01154-50	Мутация Янус-киназы 2	JAK2	Val617Phe	60
s01154-100				120
s01179-50	Мутация тромбоцитарного гликопротеина 1b, альфа субъединицы	GP1BA	Thr145Met	60
s01179-100				120
Сердечно-сосудистые заболевания - гипертензия				
s01118-50	Мутация ангиотензиногена 1	AGT	Thr174Met	60
s01118-100				120
s01119-50	Мутация ангиотензиногена 2	AGT	Met235Thr	60
s01119-100				120
s01131-50	Мутация рецептора 1-го типа ангиотензина-2	AGTR1	A1166C	60
s01131-100				120
s01182-50	Мутация - 1 синтазы окиси азота 3	NOS3	C786T	60
s01182-100				120
Сердечно-сосудистые заболевания – нарушения липидного обмена				
s01148-50	Мутация аполипопротеина E	APOE	Leu28Pro	60
s01148-100				120
s01149-50	Мутация липопротеиновой липазы	LPL	S447X	60
s01149-100				120
s01125-50	Мутация параоксоназы 1	PON1	Gln192Arg	60
s01125-100				120
s01132-50	Мутация аполипопротеина C3	APOC3	C3238G (аллель SstI или S2)	60
s01132-100				120
s01161-50	Мутация - 1 печеночной липазы	LIPC	-250 G>A	60
s01161-100				120
Сердечно-сосудистые заболевания – инсульт, инфаркт				
s01155-50	Мутация-1 интегринa альфа-2 (GP1a, тромбоцитарный рецептор коллагена)	ITGA2	C807T	60
s01155-100				120

s01179-50	Мутация тромбоцитарного гликопротеина 1b, альфа субъединицы	GP1BA	Thr145Met	60
s01179-100				120
s01118-50	Мутация ангиотензиногена 1	AGT	Thr174Met	60
s01118-100				120
s01119-50	Мутация ангиотензиногена 2	AGT	Met235Thr	60
s01119-100				120
s01182-50	Мутация - 1 синтазы окиси азота 3	NOS3	C786T	60
s01182-100				120
s01148-50	Мутация аполипопротеина E	APOE	Leu28Pro	60
s01148-100				120
Индивидуальное лекарство – подбор дозы варфарина (антикоагулянтов ряда кумарина)				
s01104-50	Чувствительность к варфарину – 1 Аллель CYP2C9*2	CYP2C9	Arg144Cys	60
s01104-100				120
s01111-50	Чувствительность к варфарину – 2 Аллель CYP2C9*3	CYP2C9	Ile359Leu	60
s01111-100				120
Индивидуальное лекарство – клопидогрел				
s01323-50	Клопидогрел 1	CYP2C19	G681A (*2)	60
s01323-100				120
s01324-50	Клопидогрел 2	CYP2C19	Trp212Ter (*3)	60
s01324-100				120
Индивидуальное лекарство – такролимус				
s01331-50	Такролимус	CYP3A5	G6986A	60
s01331-100				120
Индивидуальное лекарство – статины				
s01303-50	Мутация SLCO1B1	SLCO1B1	Val174Ala	60
s01303-100				120
Индивидуальное лекарство – переносимость алкоголя				
s01108-50	Мутация алкогольдегидрогеназы	ADH1B	Arg47His (ADH2*1/ADH2*2)	60
s01108-100				120
Антиоксидантная защита				
s01280-50	Мутация 1 митохондриальной супероксиддисмутазы 2	SOD2	T58C	60
s01280-100				120
Женское здоровье – невынашивание беременности				
s01101-50	Лейденская мутация (коагуляционный фактор V)	F5	Arg506Gln (LEIDEN)	60
s01101-100				120
s01102-50	Мутация протромбина (коагуляционный фактор II)	F 2	20210 G/A	60
s01102-100				120
s01103-50	Мутация 1 метилентетрагидрофолатредуктазы	MTHFR	Ala222Val (C677T)	60
s01103-100				120
s01124-50	Мутация редуктазы метионинсинтазы	MTRR	Ile22Met (66 a-g)	60
s01124-100				120
s01143-50	Мутация метионинсинтазы	MTR	Asp919Gly	60
s01143-100				120
s01106-50	Мутация интегрина, бета-3 (тромбоцитарный рецептор фибриногена)	ITGB3	Leu33Pro	60
s01106-100				120
s01107-50	Мутация фибриногена, бета	FGB	-455G-A	60
s01107-100				120
s01118-50	Мутация ангиотензиногена 1	AGT	Thr174Met	60
s01118-100				120
s01119-50	Мутация ангиотензиногена 2	AGT	Met235Thr	60

s01119-100				120
s01120-50	Мутация ингибитора активатора плазминогена SERPINE (PAI) 1	SERPINE (PAI) 1	-675 5G/4G	60
s01120-100				120
s01181-50	Мутация эндотелина 1	EDN1	Lys198Asn	60
s01181-100				120
s01154-50	Мутация Янус-киназы 2	JAK2	Val617Phe	60
s01154-100				120
s01313-50	Мутация SLC19A1	SLC19A1 (RFC-1)	His27Arg	60
s01313-100				120
Женское здоровье – рак молочной железы, яичников				
s01137 -50	Мутация – 1 BRCA1 Риск РМЖ и РЯ	BRCA1	185delAG	60
s01137-100				120
s01138 -50	Мутация – 2 BRCA1 Риск РМЖ и РЯ	BRCA1	5382insC	60
s01138-100				120
s01139 -50	Мутация – 1 BRCA2 Риск РМЖ и РЯ	BRCA2	6174delT	60
s01139-100				120
Различные онкологические заболевания				
s01171-50	Мутация интерлейкина 17A	IL17A	G-197A	60
s01171-100				120
s01154-50	Мутация Янус-киназы 2	JAK2	Val617Phe	60
s01154-100				120
s01262-50	Мутация – 3 киназы контрольной точки клеточного цикла Риск колоректаль-ного рака и рака простаты	CHEK2	Ile157Thr	60
s01262-100				120
s01276-50	Мутация матриксной металлопротеиназы 1	MMP1	-1607insG	60
s01276-100				120
Риск воспалительных заболеваний кишечника - болезнь Крона, язвенный колит				
s01195-50	Мутация - 3 каспазоактивирующего белка	CARD15 (NOD2)	3020 insC	60
s01195-100				120
s01194-50	Мутация - 4 каспазоактивирующего белка	CARD15 (NOD2)	Gly908Arg	60
s01194-100				120
Риск заболевания - сахарный диабет и ожирение				
s01151-50	Мутация коактиватора 1a PPARG	PPARGC1A	Gly482Ser	60
s01151-100				120
s01152-50	Мутация коактиватора 1b PPARG	PPARGC1B	Ala203Pro	60
s01152-100				120
s01332-50	Мутация PPARG	PPARG	Pro12Ala	60
s01332-100				120
s01335-50	Мутация PPARG2	PPARG2	Pro12Ala	60
s01335-100				120
s01329-50	Мутация гена, ассоциированного с жировой массой	FTO	A23525T	60
s01329-100				120
Риск заболевания – хронические болезни нижних дыхательных путей				
s01254-50	Антитрипсин 1	SERPINA1	PI Z	60
s01254-100				120
s01275-50	Мутация матриксной металлопротеиназы 12	MMP12	A-82G	60
s01275-100				120
Риск заболевания - непереносимость лактозы				
s01263-50	Лактазная недостаточность	LCT	-13910 C>T	60
s01263-100				120

Риск заболевания – нарушение иммунитета (астма, ВИЧ, онкологические заболевания)				
s01277-50	Мутация интерлейкина 1b	IL1b	T-31C	60
s01277-100				120
s01176-50	Мутация интерлейкина 4	IL4	C-589T	60
s01176-100				120
s01186-50	Мутация - 1 интерлейкина 10	IL10	G-1082A	60
s01186-100				120
s01187-50	Мутация - 2 интерлейкина 10	IL10	C-592A	60
s01187-100				120
s01171-50	Мутация интерлейкина 17A	IL17A	G-197A	60
s01171-100				120
s01177-50	Мутация фактора некроза опухоли альфа	TNF	G-308A	60
s01177-100				120
s01103-50	Мутация 1 метилентетрагидрофолатредуктазы	MTHFR	Ala222Val (C677T)	60
s01103-100				120
s01316-50	Мутация цитохрома P450 3A4	CYP3A4*1A/1B	A392G	60
s01316-100				120
Наследственные заболевания - гемохроматоз				
s01191-50	Гемохроматоз - 1	HFE	His63Asp	60
s01191-100				120
s01192-50	Гемохроматоз - 2	HFE	Ser65Cys	60
s01192-100				120
Наследственные заболевания - муковисцидоз				
s01113-50	Муковисцидоз - 1	CFTR	Phe508Del	60
s01113-100				120
s01114-50	Муковисцидоз - 2	CFTR	Gly542Ter	60
s01114-100				120
s01115-50	Муковисцидоз - 3	CFTR	Gly551Asp	60
s01115-100				120
s01116-50	Муковисцидоз - 4	CFTR	Trp1282Ter	60
s01116-100				120
s01117-50	Муковисцидоз - 5	CFTR	Asn1303Lys	60
s01117-100				120
s01158-50	Муковисцидоз - 6	CFTR	394delTT	60
s01158-100				120
s01163-50	Муковисцидоз - 7	CFTR	Arg334Trp	60
s01163-100				120
s01164-50	Муковисцидоз - 8	CFTR	3821delT	60
s01164-100				120
s01165-50	Муковисцидоз - 9	CFTR	2143delT	60
s01165-100				120
Наследственные заболевания - фенилкетонурия				
s01253-50	Фенилкетонурия - 1	PAH	Arg408Trp	60
s01253-100				120
s01190-50	Фенилкетонурия - 2	PAH	Arg261Gln	60
s01190-100				120

Список диагностических наборов для определения полиморфизмов в геноме человека постоянно пополняется. Полный список Вы можете найти на официальном сайте компании ООО НПФ «Литех» по адресу www.lytech.ru

ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ И ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ

Требования к помещениям и организации работ изложены в МУ 1.3. 2569 -09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 22 декабря 2010 г).

Требования к проведению работ с патогенными микроорганизмами изложены в Санитарных правилах СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней"

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ и РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1 этап - выделение ДНК из биопроб:

- ламинарный бокс II класса защиты
- термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8000-12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1500-3000 об/мин (или вортекс);
- пипетка-дозатор переменного объема 100-1000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые пробирки типа Эппендорф 1,5 мл с замком;
- одноразовые наконечники до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 1000 мкл;
- штатив с крышкой для хранения пробирок 1,5 мл;
- штатив для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- одноразовые перчатки;
- холодильник с морозильной камерой;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- емкость с дез. раствором для удаления плазмы крови;
- реагент для выделения ДНК из биопроб «ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ» (универсален для всех полиморфизмов).

2 этап - проведение ПЦР (амплификация):

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- микроцентрифуга-вортекс 1500-3000 тыс.об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5-50 мкл для работы с биопробами;
- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- бесцветные (возможно, оптические или с оптическими крышками) одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл или 0,2 мл для амплификации согласно требованиям производителя прибора;
- одноразовые наконечники до 10, 50, 200 и 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- комплект реагентов для проведения ПЦР (индивидуален для каждого полиморфизма);

ВЫБОР АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА и ПРОБОПОДГОТОВКА

Оптимальным исследуемым материалом для анализа является цельная венозная кровь. Возможны альтернативные методы выделения, однако надёжный результат в этом случае не гарантирован.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ЦЕЛЬНОЙ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ РЕАГЕНТА «ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ»

Взятие, доставка и хранение материала

2000 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 200 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). *Гепарин использовать не рекомендуется.*

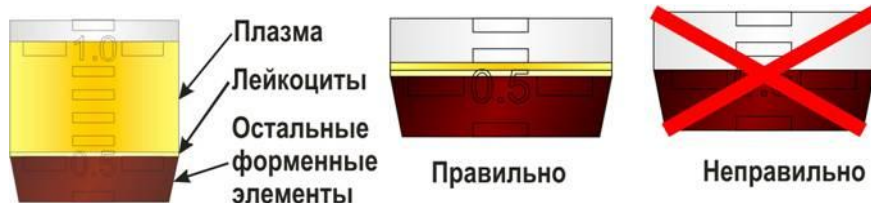
Внимание! При использовании для забора крови вакуумных пробирок с ЭДТА или цитратом натрия дополнительное внесение антикоагулянта не требуется. При этом объем крови, необходимый для исследования, заранее маркируется на пробирке в соответствии с количеством антикоагулянта, помещенного в пробирку.

Неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК; хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; *не замораживать!*

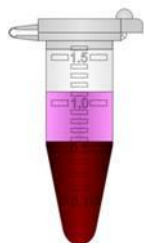
Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь»



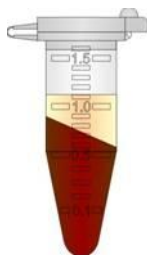
1. В пробирку типа «Эппендорф» с замком внести 1000 мкл цельной крови. Перед внесением кровь необходимо перемешать до однородности.
2. Закрыть пробирку и центрифугировать со скоростью 3000 об/мин. при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы. На поверхности осадка форменных элементов расположен тонкий слой лейкоцитов (см. рисунок внизу).
3. Аккуратно удалить пипеткой плазму, не захватив при этом лейкоциты.



ВНИМАНИЕ! Полное удаление плазмы без захвата лейкоцитов практически невозможно. Поэтому следует оставить в пробирке тонкий слой плазмы.



4. Закрыть пробирку и выдержать ее при -20°C (в морозилке) до полного замораживания форменных элементов (в течение 1 ч.).
5. Полностью разморозить содержимое пробирки при комнатной температуре.
6. Внести в пробирку реагент «ДНК-экспресс-кровь». Его объем должен быть равен объему оставшихся в пробирке форменных элементов и плазмы (в примере объем остатка равен ~550 мкл, суммарный объем остатка и реактива составил, таким образом, 1100 мкл). Закрыть пробирку, защелкнуть замочек.



7. Содержимое пробирки в течение 10 сек. тщательно перемешать на встряхивателе (вортексе).
8. Осадить капли на микроцентрифуге.
9. Установить пробирку в предварительно прогретый до 99°C термостат и выдерживать при 99°C в течение 25 минут.

Установить пробирку в высокоскоростную микроцентрифугу замком в сторону оси. Центрифугировать со скоростью 8000-14000 об/мин. при комнатной температуре в течение 1 минуты.

Полученный таким образом супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК.

Примечание. Если необходимо сохранить выделенную ДНК для дальнейшего использования, супернатант следует перенести в отдельную пробирку типа «Эппендорф» и хранить при -20°C (в морозилке) до 1 года. Перед употреблением образец необходимо полностью разморозить при комнатной температуре и тщательно перемешать.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ СЛЮНЫ С ПОМОЩЬЮ РЕАГЕНТА «ДНК-ЭКСПРЕСС»

Взятие, доставка и хранение материала

Чтобы избежать наличия примесей, образец слюны необходимо брать не ранее, чем через час после еды. Материал для исследования должен быть свежим (не охлаждать и не замораживать!)

Отобрать 1,0-0,5 мл слюны в сухую стерильную пробирку типа Эппендорфф вместимостью 1,5 мл. Использовать для выделения ДНК не позднее, чем через 24 часа.

Выделение ДНК из слюны с помощью реагента «ДНК-экспресс»

1. Пробирку отцентрифугировать в течение 15 минут при 12000 об/мин, тщательно удалить пипеткой всю жидкость, оставив на дне не более 50 мкл осадка. К осадку добавить 200 мкл реактива «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно суспендировать пипетированием или вортексированием;

2. Осадить капли на микроцентрифуге;

3. Пробирку поместить в твердотельный термостат, предварительно прогретый до 99°C, и прогреть при 99°C в течение 15 минут;

4. После прогрева пробирку перенести в высокоскоростную микроцентрифугу и центрифугировать 1 минуту при 13000-14000 об/мин при комнатной температуре;

5. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации. Для этого его аликвоту необходимо развести прошедшим пробоподготовку реактивом «ДНК-экспресс» в 5 раз (можно разводить также деионизованной водой, однако при разведении ДНК-эспрессом аликвота будет лучше храниться);

Обработанные таким образом пробы хранить при температуре -18...-20°C в течение 6 мес.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ОБРАЗЦОВ ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ СОРБЕНТНЫМ, ФЕНОЛ-ХЛОРОФОРМНЫМ МЕТОДАМИ, А ТАКЖЕ С ПОМОЩЬЮ КОЛОНОК.

Тест-системы «SNP-экспресс» работают в узком диапазоне концентраций ДНК: при слишком высокой концентрации ДНК велик риск эффективного прохождения неспецифической реакции и появления ложных гетерозигот; при слишком низкой концентрации ДНК ПЦР может не пройти вовсе. Рабочая концентрация ДНК составляет примерно 10 нг/мкл. При постановке аликвоту ДНК рекомендуется смешать в соотношении 2:3 с прошедшим пробоподготовку реагентом «ДНК-экспресс» или «ДНК-экспресс-кровь».

Внимание! Напоминаем, что надежные результаты гарантированы только при анализе геномной ДНК человека, выделенной из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» согласно инструкции.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ «SNP-ЭКСПРЕСС-PB»

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ НА ПРИБОРЕ «CFX96» (BioRad)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «CFX96» представляет собой программируемый термостат (амплификатор), сопряженный с оптической системой детекции флуоресцентного сигнала по 6 каналам (5 различных флуорофоров + 1 канал для FRET-зондов) через крышки пробирок. Система позволяет проводить ПЦР и регистрировать сигнал от образцов по заданным каналам в каждом цикле. В ходе реакции управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала от каждого образца в каждом из задействованных каналов, по которым в дальнейшем и производится анализ результатов. Для работы с наборами «SNP-экспресс-PB» используется канал SYBR.

В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с наборами «SNP-экспресс-PB». За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции производителя прибора.

2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

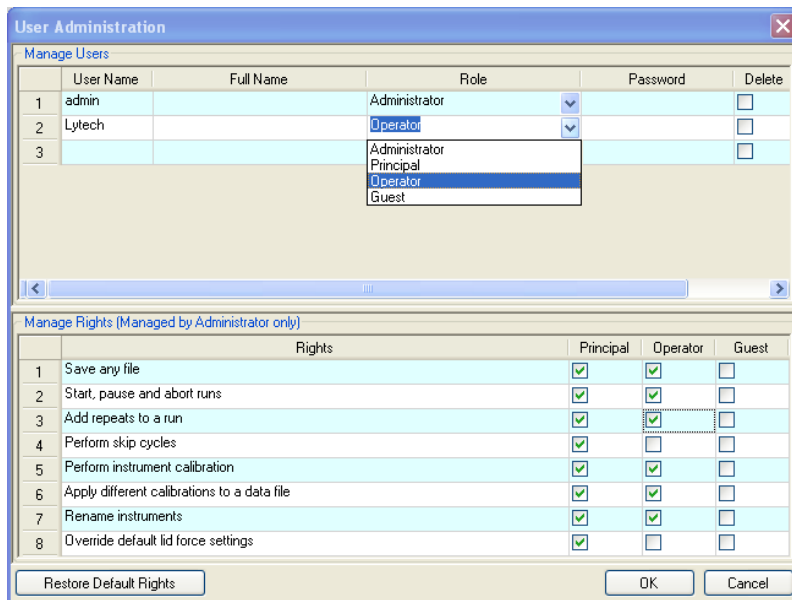
Перед первым использованием прибора с наборами «SNP-экспресс-PB» необходимо выполнить следующие действия:

2.1. Добавление пользователей. По умолчанию при установке программы устанавливается протокол пользователь «Admin», полномочия которого предполагают доступ ко всем функциям. Чтобы снизить вероятность ошибки, неправомерного изменения настроек, а также разделить папки различных операторов, можно задать дополнительных пользователей. Добавление пользователей проводится только пользователем, имеющим полномочия администратора.

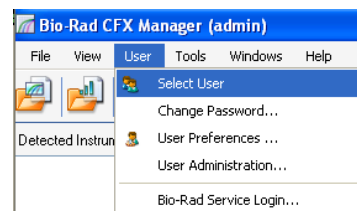
2.1.1. Выбрать в меню *User* пункт *User Administration...*




2.1.2. В окне *User Administration* в столбце *User Name* новой строки ввести имя пользователя. В столбце *Role* выбрать уровень полномочий (для оператора рекомендуется Operator – полномочия можно просмотреть и, при необходимости, отредактировать в нижней части окна). Можно указать полное имя оператора в столбце *Full Name* и задать пароль в столбце *Password*. Для принятия введенных данных нажать **Ok. Для нового пользователя автоматически будет создана своя папка.**



2.1.3. Окно смены пользователя можно вызвать либо выбрав пункт *Select User* в меню *User*,




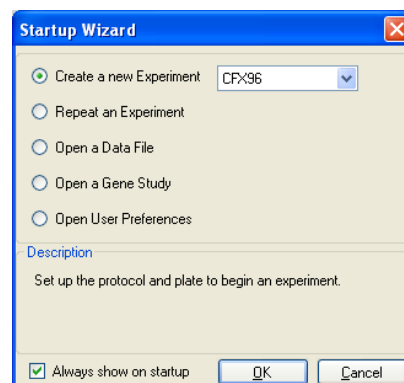
либо нажав кнопку  в основном окне управляющей программы (программа также начнёт выдавать это окно при загрузке). В появившемся окне следует выбрать пользователя из списка и, при необходимости, ввести пароль.



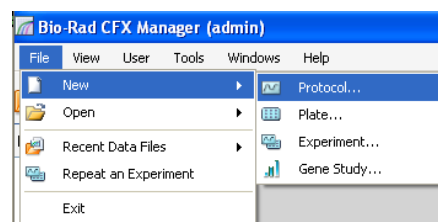
2.2. Создание протокола амплификации.

2.2.1. При запуске программы появляется окно выбора основных операций – **Startup Wizard**. Следует отметить верхнюю позицию – Создать новый эксперимент - **Create a new Experiment** и нажать кнопку **OK**. В появившемся окне **Experiment Setup** выбрать вкладку **Protocol** и в ней нажать **Create New...**. После этого откроется окно **Protocol Editor**.

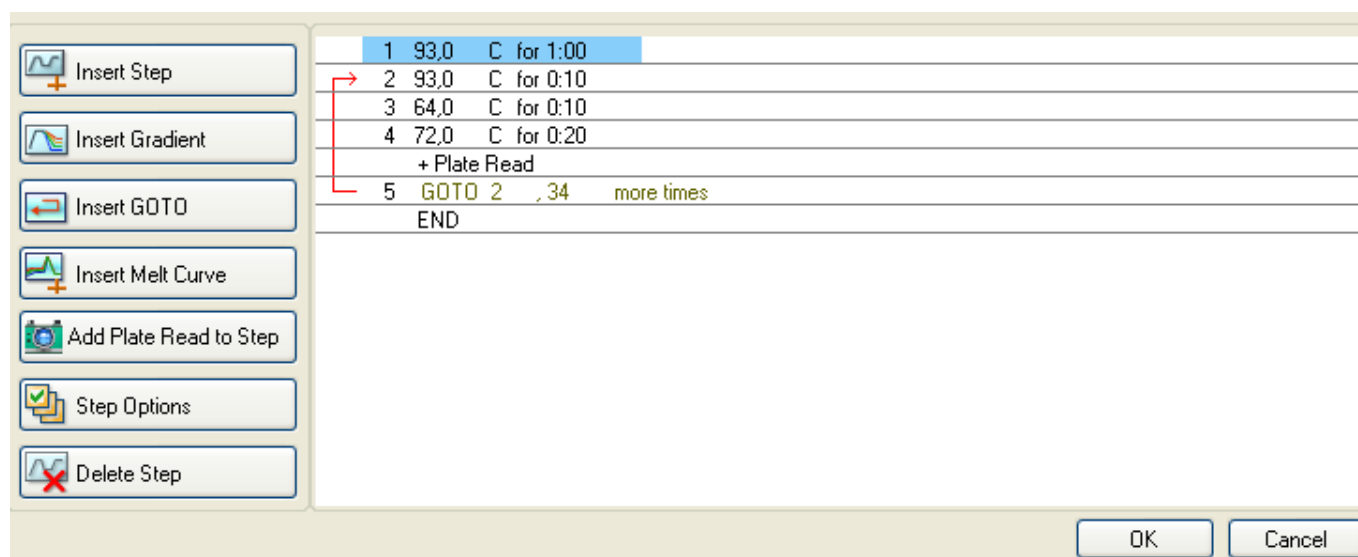
Окно **Protocol Editor** можно также вызвать кнопкой  на панели задач главного окна,



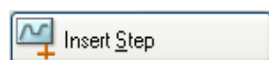
либо меню **File**, подменю **New**, пункт **Protocol...**



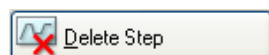
2.2.2. Создать протокол амплификации, соответствующий представленному на рисунке



используя следующие клавиши:



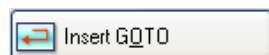
- добавляет шаг после текущего, если в поле **Insert Step** выбрано **After** и перед текущим, если в поле **Insert Step** выбрано **Before**



- удаляет текущий шаг



- добавляет в текущий шаг считывание флуоресцентного сигнала (программа сама определяет требуемое ей на данную операцию время)



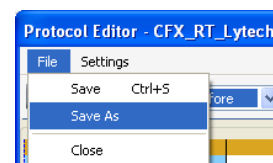
- добавляет возврат к шагу, начинающему цикл. В этом шаге указываются следующие значения:

Goto 2 , - номер шага, являющегося первым в цикле

39 more times - число возвратов (указывается значение на 1 меньше числа циклов в протоколе; для 40 циклов будет 39 возвратов)

Значения могут редактироваться как в текстовом поле, так и на графике. Для изменения следует выделить значение и ввести требуемое.

2.2.3. Для сохранения протокола следует выбрать в меню File пункт Save As. Программа предложит ввести имя протокола и сохранит его по умолчанию в папке текущего пользователя.

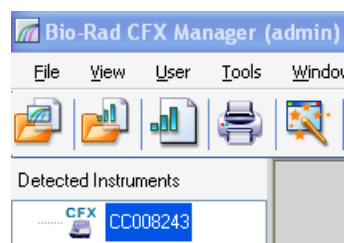


3. ПОДГОТОВКА К ПОСТАНОВКЕ РЕАКЦИИ

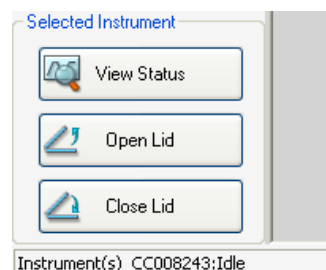
3.1. Включить прибор. Дождаться завершения его самотестирования (подробнее см. инструкцию производителя прибора).

3.2. Запустить управляющую программу. Дождаться окончания процедуры установления связи с прибором. При этом в левой части главного окна программы появятся:

а) В рамке **Detected Instruments** – номер прибора




б) Рамка **Selected Instrument**

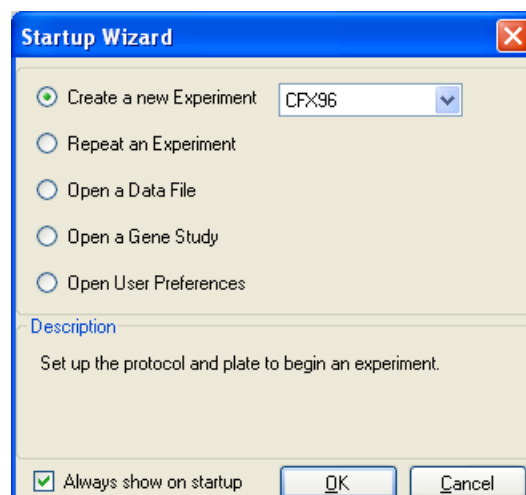


в) В строке состояния отразится состояние прибора **Idle** →

3.3. Запустить окно **Experiment Setup** любым из следующих способов:

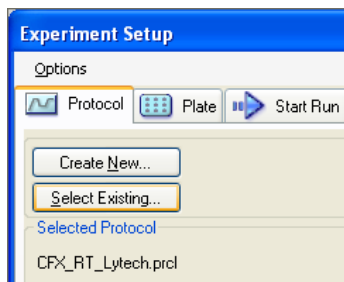
а) В окне **Startup Wizard** выбрать пункт «Create a new Experiment» и нажать кнопку **Ok**.

б) Нажать кнопку  в главном окне программы.

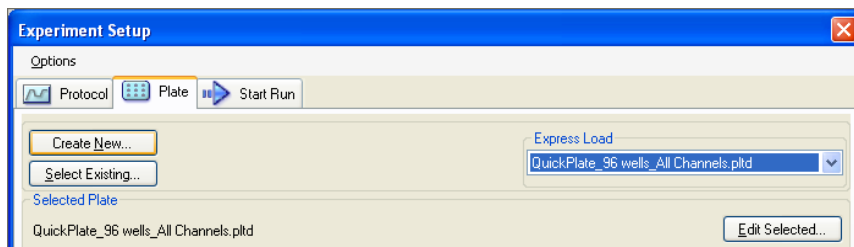


3.4. Во вкладке Protocol нажать кнопку **Select Existing...** и выбрать созданный в п. 2.2. протокол.

3.5. Нажать **Next>>** или выбрать вкладку **Plate**.

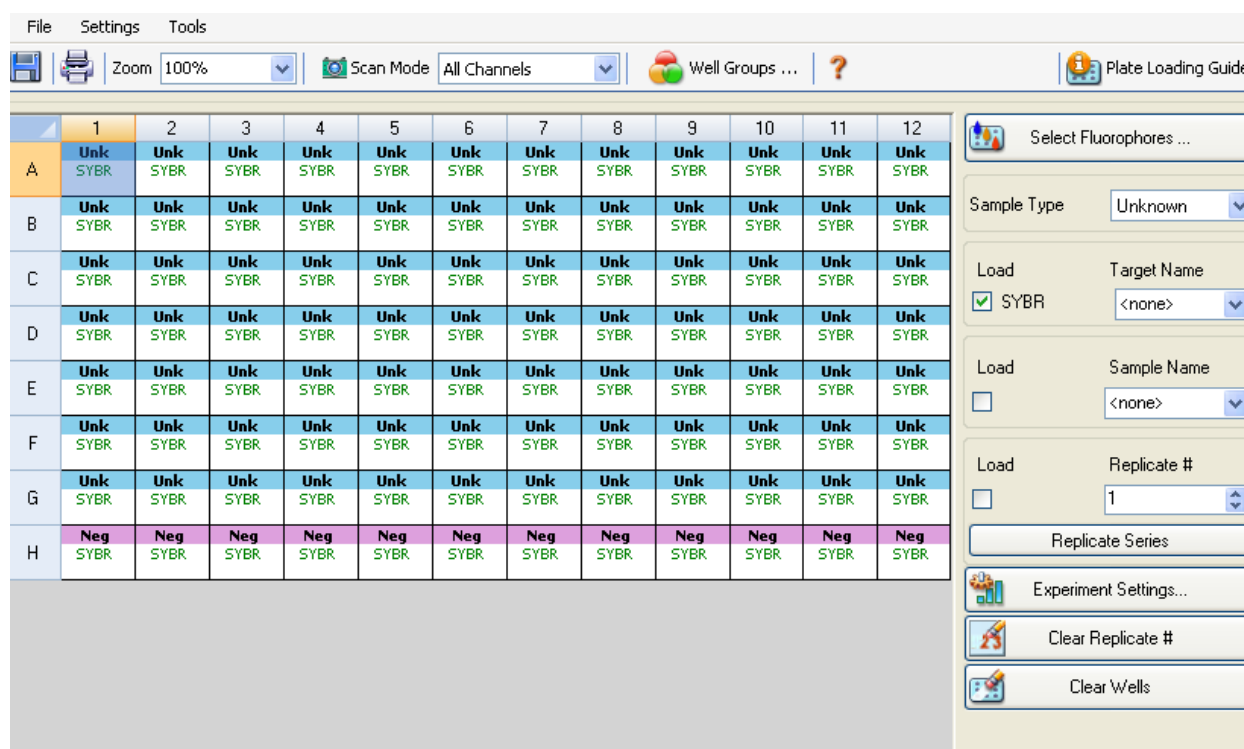


3.6. Если схема расположения образцов уже существует в виде файла, то её можно загрузить, нажав **Select Existing...** и, при необходимости, отредактировать. Для перехода к окну редактирования



(Plate Editor) следует нажать **Edit Selected...**. Для создания новой схемы нажать **Create New...**. При этом программа также перейдёт в окно Plate Editor.

3.7. Создание и редактирование схемы расположения образцов



3.7.1. Нажать кнопку **Select Fluorophores...** В списке должен быть отмечен только канал SYBR.


3.7.2. Для создания новой схемы удобней выделить прямоугольник, охватывающий все лунки, в которых будут располагаться образцы. Установить для них тип образцов **Sample Type** Unknown, затем отметить канал SYBR.

3.7.3. Выделить расположения положительных контрольных образцов (это удобно делать с нажатой клавишей **Ctrl**). Установить для них тип образцов **Positive Control, v**.

3.7.4. Выделить расположения отрицательных контрольных образцов (это удобно делать с нажатой клавишей **Ctrl**). Установить для них тип образцов **Negative Control, v**.

3.7.5. Для удаления образцов их надо выделить и нажать кнопку **Clear Wells**.

3.7.6. Проверить, чтобы был выбран режим сканирования по всем каналам **Scan Mode** All Channels.

3.7.7. Для упорядочения и более удобной обработки целесообразно сгруппировать лунки по тестам. Для этого следует нажать кнопку  Well Groups ... В открывшемся окне **Well Groups Manager**:

- Нажать кнопку **Add**.
- Внести в поле название группы.
- Выделить относящиеся к заданной группе лунки.

Повторить пункты а) - в) для всех групп. По завершении работы с окном для принятия введенной информации нажать кнопку **Ok**.

3.7.8. Сохранить протокол.

3.7.9. Нажав **Ok** покинуть окно **Plate Editor** и перейти в окно **Experiment Setup**.



3.8. В окне **Experiment Setup** нажать **Next>>** или выбрать вкладку **Start Run**.

4. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

При приготовлении рабочей амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами (фильтрами). Такие же наконечники необходимо использовать и для внесения в пробирки препарата ДНК.

Недопустимо использование для приготовления смесей реактивов из комплектов других форматов. Разбавитель, Taq-полимераза и минеральное масло являются одинаковыми для всех комплектов формата «SNP-экспресс-PB», но не могут использоваться для комплектов других форматов.

Рабочие смеси следует готовить непосредственно перед амплификацией. После внесения образца пробирки с амплификационными смесями должны быть как можно скорее помещены в амплификатор.

4.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке бесцветные пробирки с оптическими крышками, соответствующие рекомендациям производителя прибора, вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается! Для каждой пробы готовятся 2 пробирки 1 (Аллель 1) и 2 (Аллель 2).

Чаще всего при проведении ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени нанесение надписей на пробирки недопустимо. В этом случае пробирки расставляются в штативе точно в том порядке, в котором они будут стоять в приборе, и составляется карта расположения образцов.

4.2. За 20 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для ПЦР из морозильника, разморозить содержимое. Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого. Непрозрачную пробирку с красителем SYBR Green рекомендуется сначала центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе, чтобы сбросить капли с крышки на дно, затем встряхнуть для перемешивания содержимого и снова центрифугировать.

4.3. Из компонентов комплекта приготовить рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:

17,5 мкл разбавителя,

2,5 мкл реакционной смеси,

0,2 мкл красителя SYBR Green.

0,2 мкл Taq-полимеразы (вносится в последнюю очередь и перед ее внесением смесь рекомендуется немного перемешать)



Готовятся 2 рабочие смеси: с реакционной смесью **АЛЛЕЛЬ 1** и с реакционной смесью **АЛЛЕЛЬ 2**.

Смесь тщательно перемешать пипетированием (если объем <200 мкл) или импульсным вортексированием 15-20 раз.

4.4. Внести в приготовленные пробирки по 20 мкл полученной рабочей смеси.

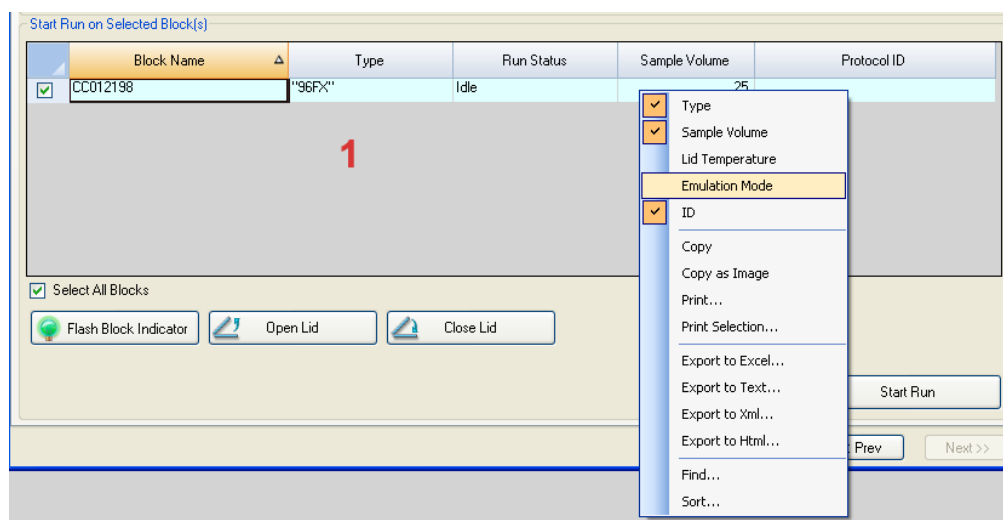
4.5. Внести по 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. выделение ДНК) в пробирку с рабочей амплификационной смесью **АЛЛЕЛЬ 1** и в пробирку с рабочей амплификационной смесью **АЛЛЕЛЬ 2**. В качестве отрицательного контрольного образца вносится разбавитель, в качестве положительного контроля - положительный контрольный образец ДНК в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

4.6. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортесе (если используются плашки или стрипованные пробирки – на предназначенной для этого центрифуге; значение угловой скорости (об/мин) в этом случае может отличаться от указанного).

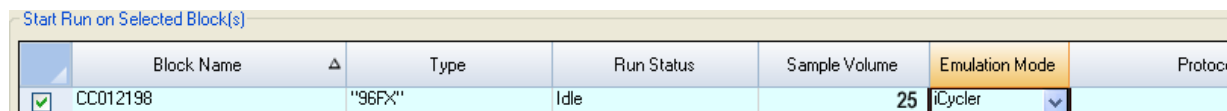
4.7. Открыть крышку системы для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени при помощи кнопки на корпусе или кнопки  **Open Lid** на вкладке **Start Run** окна **Experiment Setup**. Перенести пробирки в прибор в точном соответствии заданной схеме расположения образцов. Закрыть крышку нажатием кнопки на корпусе прибора или кнопки  **Close Lid** на вкладке **Start Run** окна **Experiment Setup**.


ВНИМАНИЕ! Ни в коем случае не открывать и не закрывать крышку прибора вручную!

4.8. В поле (1) щелкнуть правой клавишей мыши, в появившемся меню активировать пункт **Emulation mode**



4.9. В поле **Sample Volume** указать объем реакционной смеси **25** мкл, в поле **Emulation Mode** выбрать **iCycler**



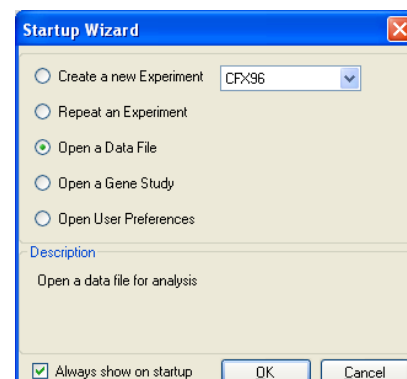
4.10. Нажать кнопку  **Start Run** на вкладке **Start Run** окна **Experiment Setup**. Программа попросит задать имя файла, в который будут записываться результаты, после чего приступит к исполнению протокола амплификации.


5. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

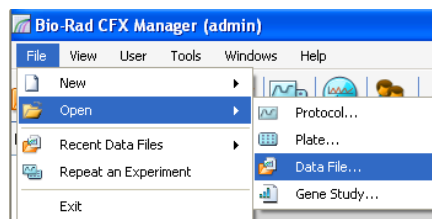
Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по заданному для образцов каналу.

6. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

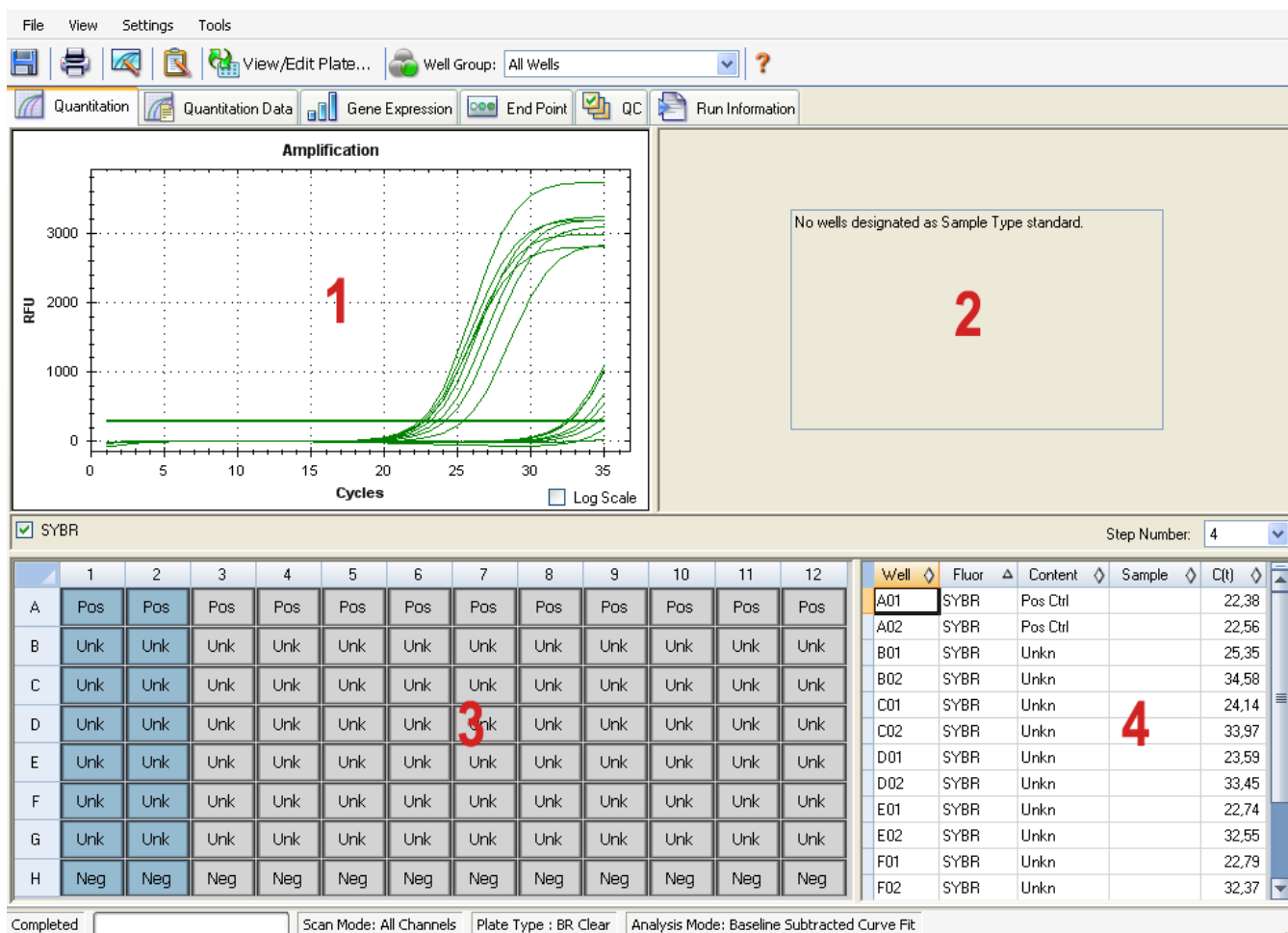
6.1. По завершении реакции появится окно **Data Analysis** в котором проводится анализ результатов ПЦР. Файл данных также может быть загружен путем выбора пункта «Open a Data File» с последующим нажатием кнопки **Ok** в окне **Startup Wizard**,



выбора пункта **Data File** в подменю **Open** меню **File** в главном окне программы или нажатием кнопки .




6.2. Структура окна анализа

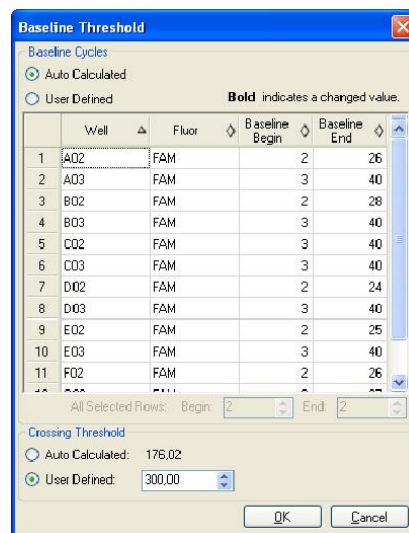


Анализ результатов проводится во вкладке **Quantitation** окна **Data Analysis**.

- 1 – окно отображения кривых накопления флуоресцентного сигнала;
- 2 – окно построения калибровочной кривой при проведении количественного анализа (в случае отсутствия в постановке стандартных образцов окно остаётся пустым);
- 3 – окно расположения образцов;
- 4 – окно отображения результатов анализа (если в постановке не участвовали стандартные образцы, то столбец **SQ** в таблице будет отсутствовать).


6.3. Настоятельно рекомендуется проводить анализ результатов отдельно для каждого полиморфизма. Если образцы были разбиты на группы (п. 3.7.7.), то в списке  **Well Group:** следует выбрать соответствующую группу и выделить в окне 3 анализируемые образцы. Если группы не заданы, то в окне 3 выделить образцы, относящиеся к одному тесту).

6.4. Кликнуть правой клавишей мыши в окне 1 и в появившемся меню выбрать пункт **Baseline Threshold...** В рамке **Crossing Threshold** выбрать «User Defined» и задать положение пороговой линии **300**. Нажать **Ok** для принятия внесённых изменений.



* - **Внимание!** Приведенные значения подходят к приборам данного типа в большинстве случаев. Однако для отдельных приборов или после перекалибровки шкала интенсивности может измениться. При правильном положении *Threshold Ct* специфических кривых находится в пределах 20-25 циклов.

6.5. По завершении этих действий программа автоматически рассчитает точки пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с линией *Threshold (Threshold Cycle, или Ct)*.

6.6. Для вывода редактора отчетов нажать кнопку . Подготовленный отчет может быть как сохранён в виде файла, так и распечатан.

ВНИМАНИЕ!

Результат считается **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ**, если значение FAM Ct образца < 27
и **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ**, если значение FAM Ct образца > 30

	АЛЛЕЛЬ 1	АЛЛЕЛЬ 2	Результат
K+	+	+	Специфическая реакция прошла
	-	+	Несрабатывание смеси АЛЛЕЛЬ 1
	+	-	Несрабатывание смеси АЛЛЕЛЬ 2
	-	-	Амплификация не прошла в обеих смесях
K-	-	-	Специфическая контаминация отсутствует, уровень праймер-димеров в пределах нормы
Анализируемы й образец	+	-	гомозигота по Аллели 1
	-	+	гомозигота по Аллели 2
	+	+	Гетерозигота
	Разница между циклами выхода не более 1,5		
	-	-	Амплификация не прошла

Для дополнительного контроля: в общем случае неспецифические слабоинтенсивные кривые (амплификация с неспецифических праймеров, праймер-димеры) выходят на **6 и более** циклов позже специфических. В случае гетерозиготы разница между Ct образца в смесях АЛЛЕЛЬ 1 и АЛЛЕЛЬ 2 находится в пределах **1,5** циклов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ и ТРАНСПОРТИРОВКИ РЕАГЕНТОВ

Комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» должен храниться при +2...+8°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при комнатной температуре не более 5 суток.

Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре минус 18-25°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при температуре не выше 0°C не более 2,5 суток.

Краситель SYBR Green должен храниться при +2...+8°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при комнатной температуре не более 5 суток.

Ни в коем случае не замораживать!

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение методики проведения исследования.

АЛФАВИТНЫЙ СПИСОК ГЕНОВ (ПО ИХ СИМВОЛАМ)

№	Ген	Название	Полиморфизм	Кат. №
1	ACE	Мутация ангиотензин-превращающего фермента	Alu Ins/Del I>D	1272
2	ADH1B	Мутация алкогольдегидрогеназы	Arg 47 His	1108
3	AGT	Мутация ангиотензиногена 1	Thr 174 Met	1118
	AGT	Мутация ангиотензиногена 2	Met 235 Thr	1119
4	AGTR1	Мутация рецептора 1-го типа ангиотензиногена-2	A 1166 C	1131
5	AHRR	Мутация репрессора арилгидрокарбонового рецептора	Pro 185 Ala	1256
6	ALDH2	Мутация альдегиддегидрогеназы	Glu 487 Lys	1112
7	AMELX	Мутация 1 амелогенина	rs17878486 T>C	1289
8	AMPD1	Мутация АМФ-дезаминазы 1	Gln 12 Ter	1183
9	ANXA5	Мутация аннексина 5	rs7676539 A>G	1293
10	APEX1 (APE1)	Мутация -1 апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы	Asp 148 Glu	1142
11	APOC3	Мутация аполипопротеина C3 (аллель SstI или S2)	C 3238 G	1132
12	APOE	Мутация аполипопротеина E	Leu 28 Pro	1148
13	ATM	Мутация-1 гена атаксии-телеангиэктазии	Asp 1853 Asn	1261
14	ATP7B	Болезнь Вильсона-Коновалова 1	His 1069 Gln	1109
	ATP7B	Болезнь Вильсона-Коновалова 2	del C3402	1122
	ATP7B	Болезнь Вильсона-Коновалова 3	Gly 1069 Arg	1123
15	ATP8A1	Мутация АТФазы II	A- 216 G	1199
16	BRCA1	Мутация -1 BRCA1	185 delAG	1137
	BRCA1	Мутация -2 BRCA1	5382 insC	1138
	BRCA1	Мутация -3 BRCA1	Cys 61 Gly	1146
	BRCA1	Мутация -4 BRCA1	4153 delA	1168
17	BRCA2	Мутация -1 BRCA2	6174 delT	1139
18	CALB2	Мутация калбиндина 2	rs8063760 T>C	1292
19	CARD15 (NOD2)	Мутация -4 каспазоактивирующего белка	Gly 908 Arg	1194
	CARD15 (NOD2)	Мутация -3 каспазоактивирующего белка	3020 insC	1195
20	CD14	Мутация антигена дифференциации моноцитов	C- 159 T	1189
21	CFH	Мутация фактора H комплемента	Tyr 402 His	1279
22	CFTR	Муковисцидоз -1	Phe 508 Del	1113
	CFTR	Муковисцидоз -2	Gly 542 Ter	1114
	CFTR	Муковисцидоз -3	Gly 551 Asp	1115
	CFTR	Муковисцидоз -4	Trp 1282 Ter	1116
	CFTR	Муковисцидоз -5	Asn 1303 Lys	1117
	CFTR	Муковисцидоз -6	394 delTT	1158
	CFTR	Муковисцидоз -7	Arg 334 Trp	1163
	CFTR	Муковисцидоз -8	3821 delT	1164
	CFTR	Муковисцидоз -9	2143 delT	1165
23	CHEK2	Мутация -1 киназы контрольной точки клеточного цикла	1100 delC	1156
	CHEK2	Мутация -2 киназы контрольной точки клеточного цикла	IVS2+1G>A	1160
	CHEK2	Мутация -3 киназы контрольной точки клеточного цикла	Ile 157 Thr	1262
24	COBL	Мутация COBL	A- 1632 G	1198
25	CRP	Мутация С-реактивного белка	C 3872 T	1157
26	CYP1A1	Мутация 4 цитохрома P450	CYP1A1	1126
27	CYP2C9	Чувствительность к варфарину -1 (аллель CYP2C9*2)	Arg 144 Cys	1104
	CYP2C9	Чувствительность к варфарину -2 (аллель CYP2C9*3)	Ile 359 Leu	1111
28	CYP2E1	Мутация "алкогольного цитохрома"	- 1293 G/C (c1/c2)	1110

29	<i>EDN1</i>	Мутация эндотелина 1	Lys 198 Asn	1181
30	<i>EFCAB4B</i>	Мутация белка 4B, содержащего EF-hand кальций-связывающий домен	G- 8037 A	1197
31	<i>EPHX1</i>	Мутация микросомальной эпоксидгидролазы	Tyr 113 His	1153
32	<i>ERCC2 (XPD)</i>	Мутация -1 гена <i>ERCC2 (XPD)</i>	Lys 751 Gln	1159
33	<i>ERCC5</i>	Мутация -1 гена <i>ERCC5 (XPG)</i>	Asp 1104 His	1174
34	<i>F2</i>	Мутация протромбина (коагуляционный фактор II)	20210 G/A	1102
35	<i>F5</i>	Лейденская мутация (коагуляционный фактор V)	Arg 506 Gln	1101
36	<i>F7</i>	Мутация коагуляционного фактора VII	Arg 353 Gln	1105
	<i>F7</i>	Мутация промотора гена коагуляционного фактора FVII	- 323 ins10bp	1135
37	<i>FCGR2A</i>	Мутация рецептора к иммуноглобулину G	His 166 Arg	1147
38	<i>FDPS</i>	Мутация фарнесилдифосфатсинтазы	c.IVS1 T-99G	1264
39	<i>FGB</i>	Мутация фибриногена, бета	- 455 G-A	1107
40	<i>GCCR</i>	Мутация рецептора к глюкагону	Asn 363 Ser	1166
41	<i>GCLC</i>	Мутация каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы	C- 129 T	1278
42	<i>GCLM</i>	Мутация регуляторной субъединицы глутаматцистеинлигазы (гамма-глутамилцистеинсинтетазы)	C 588 T	1286
43	<i>GGH</i>	Мутация гамма-глутамилгидролазы	C 401 T	1150
44	<i>GJB2</i>	Нейросенсорная несиндромальная тугоухость - 1 (мутация коннексина 26)	35 delG	1252
	<i>GJB2</i>	Нейросенсорная несиндромальная тугоухость - 2 (мутация коннексина 2)	313-326 del14	1282
	<i>GJB2</i>	Нейросенсорная несиндромальная тугоухость - 3 (мутация коннексина 3)	235 delC	1283
	<i>GJB2</i>	Нейросенсорная несиндромальная тугоухость - 4 (мутация коннексина 4)	167 delT	1284
45	<i>GP1BA</i>	Мутация тромбоцитарного гликопротеина 1b, альфа-субъединицы	Thr 145 Met	1179
46	<i>GSTP1</i>	Мутация -1 глутатион-S-трансферазы пи	Ile 105 Val	1133
	<i>GSTP1</i>	Мутация -2 глутатион-S-трансферазы пи	Ala 114 Val	1134
47	<i>HFE</i>	Гемохроматоз -1	His 63 Asp	1191
	<i>HFE</i>	Гемохроматоз -2	Ser 65 Cys	1192
	<i>HFE</i>	Гемохроматоз -3	Cys 282 Tyr	1193
48	<i>IL1b</i>	Мутация интерлейкина 1b	T- 31 C	1277
49	<i>IL2</i>	Мутация интерлейкина 2	T- 330 G	1271
50	<i>IL4</i>	Мутация интерлейкина 4	C- 589 T	1176
51	<i>IL6</i>	Мутация интерлейкина 6	C- 174 G	1270
52	<i>IL10</i>	Мутация -1 интерлейкина 10	G- 1082 A	1186
	<i>IL10</i>	Мутация-2 интерлейкина 10	C- 592 A	1187
	<i>IL10</i>	Мутация -3 интерлейкина 10	C- 819 T	1188
53	<i>IL12B</i>	Мутация интерлейкина 12B	A 1188 C	1269
54	<i>IL17A</i>	Мутация интерлейкина 17A	G- 197 A	1171
55	<i>IL17F</i>	Мутация интерлейкина 17F	His 161 Arg	1172
56	<i>ITGA2</i>	Мутация -1 интегрин альфа-2 (GP1a, тромбоцитарный рецептор коллагена)	C 807 T	1155
57	<i>ITGB3</i>	Мутация интегрин, бета-3 (GPIIIa, тромбоцитарный рецептор фибриногена)	Leu 33 Pro	1106
58	<i>JAK2</i>	Мутация Янус-киназы 2	Val 617 Phe	1154

59	<i>KLK4</i>	Мутация 1 калликреина 4	rs2664152 T>G	1290
	<i>KLK4</i>	Мутация 2 калликреина 4	rs2664153 G>A	1291
60	<i>LCT</i>	Лактазная недостаточность	-13910 C>T	1263
61	<i>LEPR</i>	Мутация рецептора лептина	Arg223Gln	1167
62	<i>LIG4</i>	Мутация-1 лигазы 4	Thr9Ile	1257
	<i>LIG4</i>	Мутация-2 лигазы 4	Ala3Val	1258
63	<i>LIPC</i>	Мутация -1 печеночной липазы	- 250G>A	1161
	<i>LIPC</i>	Мутация -2 печеночной липазы	C-514T	1162
64	<i>LPL</i>	Мутация липопротеиновой липазы	Ser447Ter	1149
65	<i>MASP1</i>	Мутация MBL-ассоциированной сериновой протеазы 1	T-193C	1250
66	<i>MASP2</i>	Мутация MBL-ассоциированной сериновой протеазы 2	Asp105Gly	1266
67	<i>MMP1</i>	Мутация матриксной металлопротеиназы 1	- 1607insG	1276
68	<i>MMP12</i>	Мутация матриксной металлопротеиназы 12	A-82G	1275
69	<i>MTHFR</i>	Мутация-1 метилентетрагидрофолатредуктазы	Ala222Val	1103
	<i>MTHFR</i>	Мутация-2 метилентетрагидрофолатредуктазы	Glu429Ala (1298 A>C)	1273
70	<i>MTR</i>	Мутация метионинсинтазы	Asp919Gly	1143
71	<i>MTRR</i>	Мутация редуктазы метионинсинтазы	Ile22Met	1124
72	<i>NAT2</i>	Мутация -1 N-ацетилтрансферазы 2	C481T	1129
	<i>NAT2</i>	Мутация -2 N-ацетилтрансферазы 2	Arg197Gln	1127
	<i>NAT2</i>	Мутация -3 N-ацетилтрансферазы 2	Lys268Arg	1130
	<i>NAT2</i>	Мутация -4 N-ацетилтрансферазы 2	Gly286Glu	1128
73	<i>NBN (NBS1)</i>	Мутация нибрина	Glu185Gln	1175
74	<i>NOS1</i>	Мутация 1 синтазы окиси азота 1	G-84A	1296
75	<i>NOS3</i>	Мутация -1 синтазы окиси азота 3	C786T	1182
76	<i>hOGG1</i>	Мутация 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы	Ser326Cys	1169
77	<i>P2RY12</i>	Мутация АДФ-рецептора тромбоцитов	H1/H2	1180
78	<i>PAH</i>	Фенилкетонурия -1	Arg408Trp	1253
	<i>PAH</i>	Фенилкетонурия -2	Arg261Gln	1190
79	<i>PARP1 (ADPRT)</i>	Мутация поли(АДФ-рибозил)полимеразы	Val762Ala	1170
80	<i>PDE3A</i>	Мутация фосфодиэстеразы 3А	A-543C	1196
81	<i>PON1</i>	Мутация параоксоназы 1	Gln192Arg	1125
82	<i>PPARGC1A</i>	Мутация коактиватора 1a PPARG	Gly482Ser	1151
83	<i>PPARGC1B</i>	Мутация коактиватора 1b PPARG	Ala203Pro	1152
84	<i>PROK2</i>	Мутация прокинетицина 2	C-6680T	1251
85	<i>SELE</i>	Мутация 1 Е-селектина	Ser128Arg	1294
	<i>SELE</i>	Мутация 2 Е-селектина	Leu554Phe	1295
86	<i>SELP</i>	Мутация Р-селектина	Thr715Pro	1287
87	<i>SERPINA1</i>	Мутация альфа 1 антитрипсина (Антитрипсин 2)	Glu264Val (PiS)	1255
	<i>SERPINA1</i>	Мутация альфа 1 антитрипсина (Антитрипсин 1)	Glu342Lys (PiZ)	1254
88	<i>SERPINE1 (PAI1)</i>	Мутация ингибитора активатора плазминогена (PAI) 1	- 675 5G/4G	1120
89	<i>SOD2</i>	Мутация 2 митохондриальной супероксиддисмутазы 2	C60T	1281
90	<i>TIMP1</i>	Мутация тканевого ингибитора металлопротеиназ 1	C536T	1288
91	<i>TLR2</i>	Мутация толл-подобного рецептора 2	Arg753Gln	1173
92	<i>TLR3</i>	Мутация толл-подобного рецептора 3	Phe412Leu	1268
93	<i>TLR4</i>	Мутация толл-подобного рецептора 4	Asp299Gly	1285
94	<i>TLR6</i>	Мутация толл-подобного рецептора 6	Ser249Pro	1178
95	<i>TLR9</i>	Мутация толл-подобного рецептора 9	T-1237C	1267
96	<i>TNF</i>	Мутация фактора некроза опухоли альфа	G-308A	1177

