



ПАМЯТКА ПО ПРИМЕНЕНИЮ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПЦР «SNP-ЭКСПРЕСС» В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ПРИНЦИП МЕТОДА

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

Анализу подвергается геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь».

С образцом выделенной ДНК параллельно проводятся две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Результаты анализа позволяют дать **три типа заключений:**

гомозигота по аллели 1; гетерозигота; гомозигота по аллели 2.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

1. Приготовить и расставить необходимое количество бесцветных пробирок с оптическими крышками вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации в соответствии с количеством анализируемых проб с учетом положительных (при наличии) и отрицательных контролей. Для каждой пробы готовятся 2 пробирки: аллель 1 и аллель 2.
2. За 20-30 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 перемешать. Перемешивание разбавителя происходит при переворачивании пробирки (пузырём воздуха). Перемешивание реакционной смеси проводят вортиксованием.
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 перемешать)

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

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.

4. После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.
5. Добавить по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки, подготовленные для амплификации.
6. Внести по 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы 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 объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси. Положительный контрольный образец вносится в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.
7. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1500–3000 об/мин при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе.
8. Создать протокол расположения образцов.

Для работы с наборами «SNP-ЭКСПРЕСС-PB» используется канал FAM.

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.

9. Перенести пробирки в прибор и провести амплификацию по следующей программе:

«CFX 96» (BioRad)

Важно: режим Emulation Mode
iCycler

приблизительное время работы 40
мин

+93 °C	1 мин	35 циклов
+93 °C	10 сек	
+64 °C	10 сек	
+72 °C	20 сек (считывание)	

«iCycler IQ5» (BioRad)

ДТ-96 (ДНК-Технология)

приблизительное время работы 1 час

+93 °C	1 мин	35 циклов
+93 °C	10 сек	
+64 °C	10 сек	
+72 °C	20 сек (считывание)	

ДТ-Lite (ДНК-Технология)

приблизительное время работы 1 час

+93 °C	1 мин	35 циклов
+93 °C	10 сек	
+64 °C	15 сек	
+72 °C	20 сек (считывание)	

«Rotor-Gene 6000/Q» (Corbett
Research)

приблизительное время работы 1 час

+93 °C	1 мин	35 циклов
+93 °C	10 сек	
+60 °C	10 сек	
+72 °C	20 сек (считывание)	

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат считается положительным, если значение FAM Ct образца < 27, и отрицательным, если значение FAM Ct образца > 30.

	Аллель 1	Аллель 2	Результат
К+	+	+	Специфическая реакция прошла
	-	+	Несрабатывание смеси Аллель 1 , возможно нарушение методики постановки
	+	-	Несрабатывание смеси Аллель 2 , возможно нарушение методики постановки
	-	-	Амплификация не прошла в обоих смесях, возможно нарушение методики постановки
К-	-	-	Специфическая контаминация отсутствует, уровень праймер-димеров в пределах нормы
Анализируемый образец	+	-	Гомозигота по аллели 1
	-	+	Гомозигота по аллели 2
	+	+	Гетерозигота
	-	-	Амплификация не прошла

Для дополнительного контроля: в общем случае неспецифические слабоинтенсивные кривые (амплификация с неспецифических праймеров, праймер-димеры) выходят на 6-10 циклов позже специфических. В случае гетерозиготы разница между Ct образца в смесях Аллель 1 и Аллель 2 находится в пределах 1-1,5 циклов.

Полное руководство по применению диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР «SNP-ЭКСПРЕСС» находится на сайте www.lytech.ru в разделе «Методическая информация».

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»:

телефон (495) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru