



**Инструкция для  
наборов на определение  
мутаций в гене *CFTR*  
(Мук-1-12-100)**

Дата изменения: 05.02.2021



## Содержание

Компоненты набора .....	4
Область применения .....	4
Гарантия .....	4
Описание .....	5
Необходимое оборудование .....	5
Важные замечания .....	5
Меры предосторожности .....	6
Выделение ДНК .....	6
Необходимые контрольные образцы .....	6
Постановка ПЦР .....	7
Анализ результатов .....	8
Проблемы и рекомендации .....	11
Хранение и стабильность .....	11
Служба технической поддержки .....	11
Информация для заказов .....	12
Дополнение 1 .....	13
Дополнение 2 .....	15

## Компоненты набора

Компоненты	количество
	100 реакций
Микс ПЦР	1500мкл
S-Таг полимеразы	55 мкл
Контрольный образец с аллелью дикого типа	300мкл
Контрольный образец с мутантной аллелью	300 мкл
Контрольный образец с аллелями дикого и мутантного типа	300 мкл

## Область применения

Наборы предназначены для определения мутаций в гене *CFTR* человека: del2,3, F508, W1282X, G542X, N1303K, 2143delT, 2184insA, 3821delT, 3849+10kbC>T, L138, 3944delGT, 394delTT с помощью ПЦР в реальном времени. Наборы позволяют определять как гомо-, так и гетерозиготы по каждой мутации, постановкой реакции в одной пробирке. **Каждый набор позволяет выявить только одну конкретную мутацию (обозначена на упаковке набора)**. Каждый набор рассчитан на проведение 100 реакций, включая контроли. Только для научно-исследовательских целей.

## Гарантия

Фрактал Био гарантирует изготовление всех продуктов согласно описанию в руководстве. Покупатель должен определить соответствие продукта для конкретного его использования. Если продукт не дает заявленного результата по любой причине, за исключением неправильного использования, мы бесплатно произведем замену продукта или вернем покупателю его полную стоимость. Мы сохраняем за собой право изменять или модифицировать любой продукт в целях улучшения его качеств и дизайна. Если у вас возникли вопросы по применению продукта или оценке результата, вы можете обращаться в Службу технической поддержки (см. на обороте).

## Описание

Муковисцидоз – частое моногенное заболевание, обусловленное мутацией гена *CFTR*. Выявлено более 1700 мутаций гена, ответственных за развитие симптомов муковисцидоза. Мутации del2,3, F508, W1282X, G542X, N1303K, 2143delT, 2184insA, 3821delT, 3849+10kbC>T, L138, 3944delGT, 394delTT входят в число наиболее распространенных мутаций муковисцидоза. Анализ определения каждой мутации с помощью данных наборов состоит из двух этапов: 1) проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в реальном времени, 2) анализ результатов.

Для анализа используют ДНК человека, выделенную из буккального эпителия, цельной крови (лейкоцитов) или фрагментов тканей.

Для детекции и анализа результатов используются два канала, имеющиеся практически во всех амплификаторах для ПЦР в реальном времени:

- 1) Канал **R6G** (аналоги - Joe/Vic/Tet/Hex): макс. поглощения 530 нм, макс. флуоресценции 570 нм; анализ аллели дикого типа
- 2) Канал **Fam** (аналог - Sybr Green): макс. поглощения 495 нм, макс. флуоресценции 520 нм; анализ мутантной аллели

## Необходимое оборудование

- Амплификатор для ПЦР в реальном времени
- ПЦР-бокс
- Набор дозаторов
- Штативы для наконечников и микропробирок
- Одноразовые наконечники с фильтрами для дозаторов
- Одноразовые полипропиленовые микропробирки объемом 0,2 (0,5) мл
- Отдельный халат и одноразовые перчатки

## Важные замечания

- Приготовление реакционных смесей для ПЦР необходимо проводить в ПЦР-боксе.
- Работать только в одноразовых перчатках.
- При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку “DNase-free”.

- Для приготовления смесей и добавления нуклеиновых кислот используйте только наконечники с фильтрами.
- Всё лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы, должны быть строго стационарным.

## Меры предосторожности

При приготовлении смесей используйте индивидуальные средства защиты. Компоненты набора не обладают токсическими и другими свойствами, за счёт которых возможно негативное воздействие на человека.

## Выделение ДНК

Выделение ДНК из образцов клинического материала может проводиться различными методами, например, с помощью наборов на основе силики, наборов с микроцентрифужными колонками, наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Мы рекомендуем использовать наборы для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала “ФБиоНуклео” (Фрактал Био). При использовании набора “ФБиоНуклео”, ДНК рекомендуется элюировать в 100 мкл ЕБ буфера.

При выделении ДНК необходимо проводить **отрицательный контроль** – выделение ДНК из воды. Этот же образец следует использовать при постановке ПЦР

## Необходимые контрольные образцы

Этап выделения ДНК

- Отрицательный контрольный образец (выделение ДНК из воды)

Этап постановки ПЦР:

- Отрицательный контрольный образец (вода или продукт выделения ДНК из воды)
- Три положительных контрольных образца (входят в состав набора):
  1. Контрольный образец с аллелью дикого типа (**КО wt**)
  2. Контрольный образец с аллелью мутантного типа (**КО mut**)

3. Контрольный образец с аллелями дикого и мутантного типов (**KO wt+mut**)

## Постановка ПЦР

Отберите необходимое количество микропробирок для ПЦР с учётом контрольных образцов.

1. В отдельной стерильной пробирке (1,5 мл) смешайте входящие в набор Микс ПЦР и S-Тaq полимеразу, в указанных ниже пропорциях:

Компонент	На 1 реакцию (мкл)	На N реакций (мкл)
<b>Микс ПЦР</b>	15	15xN
<b>S-Тaq полимеразы</b>	0,5	0,5xN

**Важно!** При добавлении S-Тaq полимеразы обязательно погружайте наконечник в раствор и пипетируйте для полного смывания фермента с наконечника пипетки. S-Тaq полимеразу следует убрать на -20°C сразу после добавления.

2. Перемешайте подготовленную смесь на вортексе и осадите капли кратковременным центрифугированием (2-3 сек).
3. После приготовления смеси перенесите по 15 мкл в каждую микропробирку для ПЦР.
4. Внесите в первую микропробирку с ПЦР смесью 10 мкл отрицательного контрольного образца (КО-).
5. В следующие микропробирки добавьте по 10 мкл исследуемых проб.
6. В последние три микропробирки добавьте по 10 мкл каждого контрольного образца (KOWt, KOMut, KOWt+mut).

**Важно!** Пробирки с положительными контрольными образцами, входящие в набор, открывайте только после раскапывания и закрытия крышек всех микропробирок с исследуемыми пробами для предотвращения контаминации.

7. Поместите микропробирки в амплификатор и запустите программу амплификации:

Температура	Время (сек)	Кол-во циклов
95°C	180	1
60°C	15	40
95°C	01	

В дополнении 1 находится краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора iQ5 iCycler (BioRad).

В дополнении 2 находится краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора Rotor-Gene 6000 (Qiagen)

## Анализ результатов

Анализ результатов осуществляется путём определения Ct исследуемых проб и сравнения графиков кривых флуоресценции проб с графиками кривых контрольных образцов.

По таблице 1 проверьте значения Ct контрольных образцов.

**Таблица 1.** Значения Ct для контрольных образцов.

	Канал <b>R6G</b>	Канал <b>Fam</b>
(-) КО	нет	нет
КО wt	< 30	нет
КО mut	нет	< 30
КО wt+mut	< 30	< 30

При соответствии всех значений контрольных образцов, определите Ct исследуемых проб, сравните графики кривых флуоресценции проб с графиками кривых флуоресценции контрольных образцов и определите генотип пробы по таблице 2.

Если хоть одно значение КО не выполняется, обратитесь к разделу Проблемы и рекомендации.

**Таблица 2.** Определение генотипа исследуемой пробы по значениям Ct.

Канал <b>R6G</b>	Канал <b>Fam</b>	Генотип
< 32	нет	Гомозигота по аллели <b>дикого типа</b>
нет	< 32	Гомозигота по аллели <b>мутантного типа</b>
< 32*	< 32*	Гетерозигота

\* В случае гетерозиготы значения по обоим каналам не должны различаться более чем на 3 цикла.

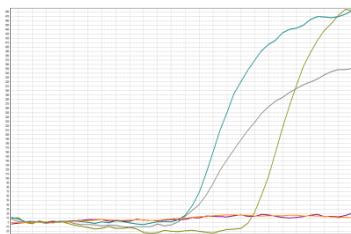


## Пример анализа результатов

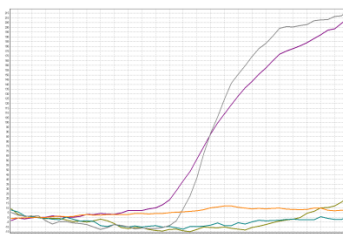
### Гомозигота по аллели мутантного типа

Ct < 32 по каналу FAM и >40 по каналу R6G

FAM



R6G

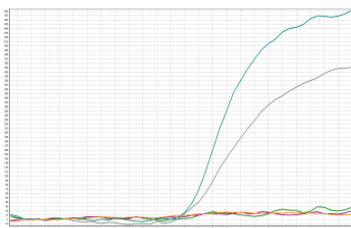


- КО с аллелью мутантного типа
- КО с аллелью дикого типа
- КО с аллелями дикого и мутантного типов
- исследуемая проба
- отрицательный контрольный образец

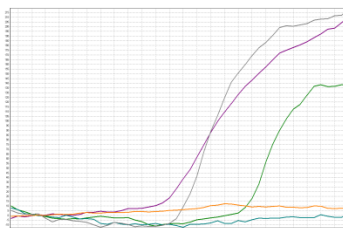
### Гомозигота по аллели дикого типа

Ct < 32 по каналу R6G и >40 по каналу FAM

FAM



R6G

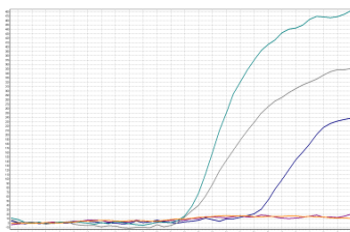


- КО с аллелью мутантного типа
- КО с аллелью дикого типа
- КО с аллелями дикого и мутантного типов
- исследуемая проба
- отрицательный контрольный образец

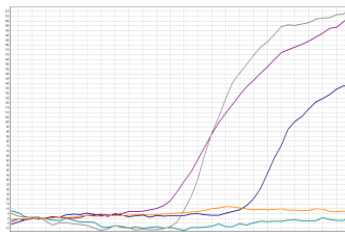
## Гетерозигота

– Ct < 32 по обоим каналам

FAM



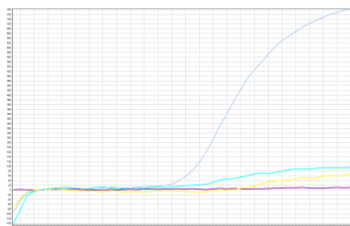
R6G



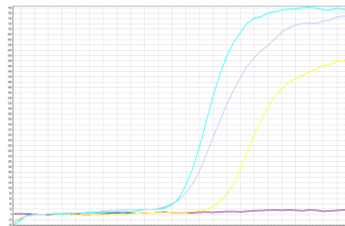
- КО с аллелью мутантного типа
- КО с аллелью дикого типа
- КО с аллелями дикого и мутантного типов
- исследуемая проба
- отрицательный контрольный образец

**Важно!** В зависимости от настроек и калибровки амплификатора, возможна фоновая флуоресценция по каналу FAM (до 10% от значения по каналу R6G, см. рис. 1).

FAM



R6G



**Рисунок 1.** Фоновая флуоресценция КО с аллелью дикого типа и исследуемой пробы по каналу FAM.

- КО с аллелью дикого типа
- КО с аллелями дикого и мутантного типов
- исследуемая проба
- отрицательный контрольный образец

## Проблемы и рекомендации

$C_t$ для положительных контрольных образцов > 32	Убедитесь, что не вышел срок годности. Обратитесь к производителю
$C_t$ для отрицательного контроля <40	Контаминация. Проведите мероприятия по очистке оборудования и помещения от контаминантов. Смените реактивы. Возможно, установлены некорректные параметры для расчёта.
$C_t$ для проб по обоим каналам >32	Маленькое количество ДНК. Проведите выделение заново. По возможности сконцентрировав образец.

## Хранение и стабильность

Компоненты набора хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Срок хранения 6 месяцев.

## Служба технической поддержки

В случае появления вопросов обращайтесь в службу технической поддержки: [technic@fractalbio.com](mailto:technic@fractalbio.com).

## Информация для заказов

Наименование	Кат.номер
Набор для определения мутации del2,3 в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-1-100</b>
Набор для определения мутации ΔF508 в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-2-100</b>
Набор для определения мутации W1282X в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-3-100</b>
Набор для определения мутации G542X в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-4-100</b>
Набор для определения мутации N1303K в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-5-100</b>
Набор для определения мутации 2143delT в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-6-100</b>
Набор для определения мутации 2184insA в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-7-100</b>
Набор для определения мутации 3821 в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-8-100</b>
Набор для определения мутации 3849+10kbC>T в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-9-100</b>
Набор для определения мутации L138 ins в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-10-100</b>
Набор для определения мутации 3944 del GT в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-11-100</b>
Набор для определения мутации 394 delTT в гене <i>CFTR</i> (на 100 реакций)	<b>Мук-12-100</b>
Набор «ФБиоНуклео» для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала (на 100 выделений)	<b>НК-1-100</b>

## Дополнение 1

### Краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора iQ5 iCycler (BioRad)

При использовании iQ5 iCycler амплификатора необходимо прогреть блок до запуска ПЦР (примерно 10 минут).

Выполняйте пункты 1-7 раздела Постановка ПЦР данной инструкции.

1. Установите микропробирки в термоблок амплификатора и запустите программное обеспечение BioRad iQ5.
2. Отредактируйте настройки плашки в производственном модуле (**Workshop**→**Setup** →**Plate**→выберите файл → **Edit**). Установите:
  - Название эксперимента
  - Флуорофоры – FAM, HEX
  - Объём реакции – 25 мкл
  - Выберите используемый способ герметизации (Seal type) – плёнка (film)/выпуклая крышка (domed cap)/плоская крышка (flat cap)
  - Выберите используемый тип сосуда (Vessel type) – планшеты (plates)/стрипы (strips)/пробирки(tubes)

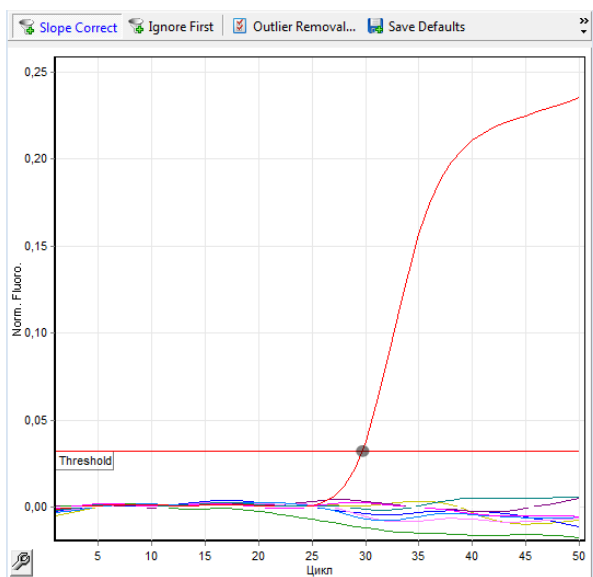
**Важно!** Выбранные параметры должны соответствовать калибровочным!

- Задайте расстановку и характеристику микропробирок с помощью пиктограмм
  - Задайте названия образцам с помощью кнопки **Spreadsheet**  
Сохраните созданную конфигурацию планшета нажав кнопку Сохранить и выйти из редактора планшета (**Save & Exit Plate Editing**). Просмотреть созданную конфигурацию можно с помощью кнопки **Plate Summary**.
3. Создайте новый температурный протокол (**Workshop** → **Setup**→ **Protocol**→ **Selected protocol**→ **Create new**) согласно таблице:

Количество циклов	Температура	Время	Детекция флуоресценции по каналам FAM/HEX
1	95 °C	180 сек	нет
40	60 °C	30 сек	да
	95 °C	10 сек	нет

Нажмите **Save & Exit Protocol Editing** (Сохранить и выйти из редактора протокола).

4. Нажмите кнопку **Run**, в открывшемся окне установите способ определения фона ячеек – постоянные факторы лунок (Persistent well factors)
5. Запустите программу с помощью кнопки **Begin Run**. После запуска ПЦР откроется окно Просмотр эксперимента (Monitor run), в котором можно следить за ходом ПЦР в реальном времени.
6. После окончания ПЦР появится окно Run status. Для просмотра анализа данных нажмите Да. Для выхода из программы нажмите Нет.
7. Установите Threshold – 100. Далее вручную опустите пороговую линию в окне с графиками флуоресценции до уровня начала линейного участка для графика, соответствующего КО+. См. рис. 1. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом Анализ результатов данной инструкции



**Рис. 1.** Выставление пороговой линии на начале линейного участка для КО+

## Дополнение 2

### Краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора Rotor-Gene 6000 (Qiagen)

Выполняйте пункты 1-7 раздела Постановка ПЦР данной инструкции.

1. Установите микропробирки в амплификатор и уравновесьте ротор.
2. Запустите программное обеспечение к амплификатору Rotor-Gene 6000.
3. Создайте новый протокол (**New Run** → **Advanced** → **New**):
  - Установите использующийся тип ротора
  - Установите использующийся тип пробирок
  - Задайте объём реакционной смеси (Reaction volume) – 25 мкл.
  - Измените температурного профиля (кнопка **Edit profile...**) согласно таблице:

Стадия	Температура	Время	Считывание
<b>Hold</b>	95 °C	180 сек	
<b>Cycling</b> This cycle repeats 40 times	60 °C	30 сек	Acquiring to Cycle A on Green, Yellow
	95 °C	10 сек	Don't acquire

При изменении температурного профиля для каждого шага должен быть задан Timed Step, а флажки для параметров Long Range и Touchdown отсутствовать.

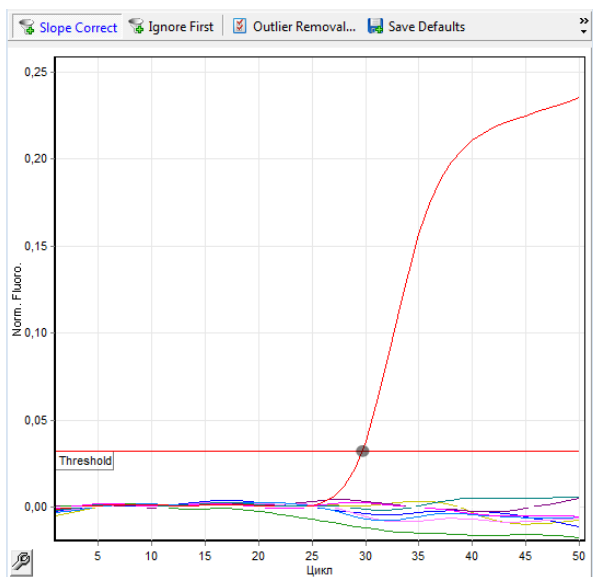
- Установите оптимизацию (**Gain optimisation** → **Optimise acquiring** → **Perform optimization before 1<sup>st</sup> acquisition**):

Для канала Yellow установите параметры Min Reading – 5F1 и Max Reading 10F1

Для канала Green установите параметры Min Reading – 15F1 и Max Reading 20F1

4. В окне Summery проверьте корректность настроек и запустите амплификацию (**Start run**)
5. После запуска ПЦР, отредактируйте положение микропробирок в роторе (**Edit samples...**).  
Номера строк в списке образцов соответствуют номерам ячеек амплификатора.

6. После завершения амплификации проведите анализ результатов по каждому каналу в отдельности (**Analysis** → **Quantitation** → **Cycling A. Yellow (Green)** → **Show**)
7. Установите следующие параметры:
  - Отмените **Auto-find threshold**
  - Активируйте кнопки **Dynamic tube** и **Slope correct**
  - Выберите линейную шкалу графического изображения (**Linear scale**; если эта шкала активна по умолчанию, то в нижней части окна находится кнопка **Log Scale**)
  - Нажав кнопку **More settings**, установите **NTC threshold** – 10%
8. В разделе **CT calculation** установите **Threshold** – 0,1. Далее вручную опустите пороговую линию в окне с графиками флуоресценции до уровня начала линейного участка для графика, соответствующего **KO+**. См. рис. 2. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом **Анализ результатов** данной инструкции



**Рис. 2. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для **KO+****



**Для заметок**

**Для заметок**

Произведено: ООО “Фрактал Био”, 190020, г. Санкт-Петербург,  
ул. Бумажная, д. 17  
сайт: [fractalbio.com](http://fractalbio.com)  
E-mail: [info@fractalbio.com](mailto:info@fractalbio.com)  
Контактный телефон/факс: (812) 495-96-95