

Набор для определения мутаций в генах *GSTT1*, *GSTM1*



Артикул: Дет-3,4-100 (на 100 реакций)

Компоненты набора

Компоненты	Количество реакций
	100 реакций
Микс ПЦР	1500 мкл
S-Таг полимеразы	55 мкл
Положительный контрольный образец (КО+)	300 мкл

Область применения

Наборы предназначены для определения делеции гена *GSTT1* и *GSTM1*, с помощью ПЦР в реальном времени. Наборы позволяют определять гомозиготы по делеции, и не позволяет выявить гетерозиготы. **Каждый набор позволяет выявить только одну конкретную мутацию (обозначена на упаковке набора).**

Чувствительность набора до 10^3 /мл геном эквивалентов в исходной пробе.

Набор рассчитан на проведение 100 реакций, включая контроль.

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 качества и дизайна.

Если у вас возникли вопросы по применению продукта или оценке результата, вы можете обращаться в Службу технической поддержки.

Описание

Ген *GSTT1* кодирует фермент тета-1 глутатион S-трансферазу, который играет существенную роль во второй фазе детоксикации ксенобиотиков. В случае делеции (отсутствия) гена *GSTT1* фермент не образуется, в результате чего способность организма избавляться от некоторых вредных соединений значительно снижается. Частота встречаемости данной мутации в популяции 16-25%.

Ген *GSTM1* кодирует фермент мю-1 глутатион S-трансферазу, который играет существенную роль во второй фазе детоксикации ксенобиотиков. В случае делеции (отсутствия) гена *GSTM1* фермент не образуется, в результате чего способность организма избавляться от некоторых вредных соединений значительно снижается. Частота встречаемости данной мутации в популяции 40-45%.

Процедура анализа состоит из двух этапов: 1) проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в реальном времени, 2) анализ результатов. Для анализа используют ДНК человека, выделенную из Buccalного 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 Fam (аналог - Sybr Green): макс. поглощения 495 нм, макс. флуоресценции 520 нм; флуоресценции 520 нм; детекция внутреннего контроля.
2. Канал R6G (аналоги - Joe/Vic/Tet/Hex): макс. поглощения 530 нм, макс. флуоресценции 570 нм; детекция гена *GSTT1*, *GSTM1*.

Необходимое оборудование и материалы

Организация работы ПЦР-лаборатории должна соответствовать методическому указанию МУ 1.3.2569-09.

Для работы с набором необходимы следующие оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Амплификатор для ПЦР в реальном времени
- ПЦР-боксы
- 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

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.

Важные замечания

1. Приготовление реакционных смесей для ПЦР необходимо проводить в ПЦР-боксе.
2. Работать только в одноразовых перчатках.
3. При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».
4. Для приготовления смесей и добавления нуклеиновых кислот используйте только наконечники с фильтрами.
5. Всё лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы, должны быть строго стационарным.

Необходимые контрольные образцы

Этап выделения НК:

- Отрицательный контрольный образец (выделение НК из воды)

Этап постановки ПЦР:

- Отрицательный контрольный образец (отрицательный контрольный образец выделения НК или вода)
- Положительный контрольный образец КО+ (входит в состав набора)

Выделение НК

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.

Постановка ПЦР

Отберите необходимое количество микропробирок для ПЦР с учетом 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
Микс ПЦР	15	15xN
S-Тaq полимеразы	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 последнюю микропробирку добавьте 10 мкл контрольного образца (КО+).
7. **Важно!** Пробирки с положительными контрольными образцами, входящие в набор, открывайте только после раскапывания и закрывайте крышек всех микропробирок с

исследуемыми пробами для предотвращения контаминации.

- Поместите микропробирки в амплификатор и запустите программу амплификации:

Температура	Время (сек)	Кол-во циклов
95°C	180	1
60°C	15	40
95°C	5	

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 R6G	Канал FAM
КО-	нет	нет
КО+	<35	<35

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.

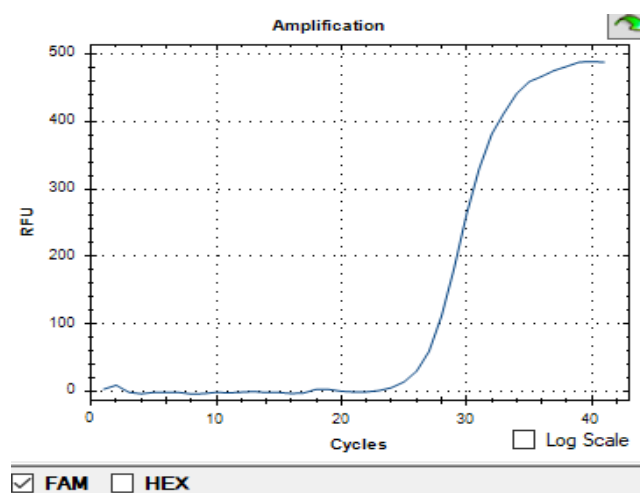
Таблица 2. Определение генотипа исследуемой пробы по значениям Ct.

Канал R6G	Канал FAM	Результат
отсутствует	<35	Делеция гена
<35	<35	Ген присутствует

Пример анализа результатов

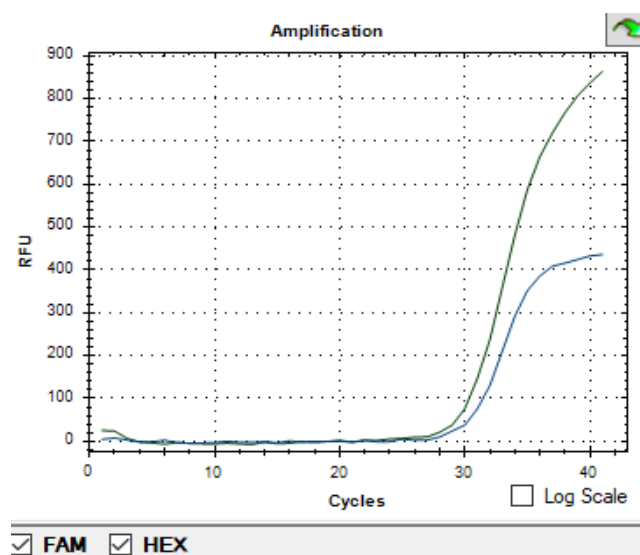
1. Делеция гена

По каналу FAM Ct <35, по R6G Ct отсутствует.



2. Ген присутствует

По каналу FAM Ct <35, по R6G Ct <35



Проблемы и рекомендации

Ct для положительных контрольных образцов > 35	Убедитесь, что не вышел срок годности. Обратитесь к производителю
Ct для отрицательного контроля <40	Контаминация. Проведите мероприятия по очистке оборудования и помещения от контаминантов. Смените реактивы. Возможно, установлены некорректные параметры для расчёта.

С _t для проб по обоим каналам >35	Маленькое количество ДНК. Проведите выделение заново (по возможности сконцентрировав образец).
--	---

Хранение и стабильность

Срок годности: 12 месяцев.

Температурный режим хранения компонентов набора.

Наборы реагентов для ПЦР – при -20°C.

Транспортировку набора можно осуществлять всеми видами крытого транспорта. Допускается кратковременное хранение при 2-15°C не более 7 суток.

Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Служба технической поддержки

В случае появления вопросов обращайтесь в службу тех. поддержки: info@fractalbio.com

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**).
3. 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**.

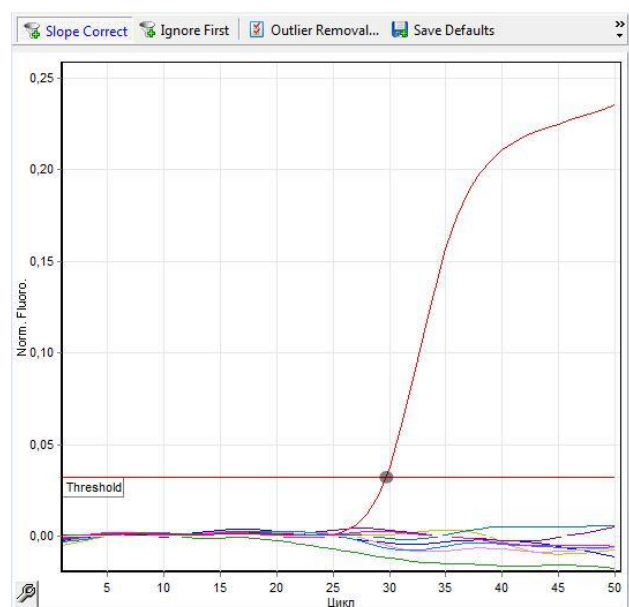
4. Создайте новый температурный протокол (**Workshop** → **Setup** → **Protocol** → **Selected protocol** → **Create new**) согласно таблице ниже.

Кол-во циклов	Температура	Время	Детекция
1	95°C	180 сек	нет
40	60°C	15 сек	да

5. Нажмите **Save & Exit Protocol Editing** (Сохранить и выйти из редактора протокола).
6. Нажмите кнопку **Run**, в открывшемся окне установите способ определения фона ячеек – постоянные факторы лунок (Persistent well factors).

7. Запустите программу с помощью кнопки **Begin Run**.
8. После запуска ПЦР откроется окно Просмотр эксперимента (Monitor run), в котором можно следить за ходом ПЦР в реальном времени.
9. После окончания ПЦР появится окно Run status. Для просмотра анализа данных нажмите «Да». Для выхода из программы нажмите «Нет».
10. 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.

Рисунок 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 используемый тип ротора
 - Установите используемый тип пробирок
 - Задайте объём реакционной смеси (Reaction volume) – 25 мкл
 - Измените температурного профиля (кнопка **Edit profile...**) согласно таблице:

Стадия	Температура	Время	Считывание
Hold	95°C	180 сек	–
Cycling This cycle repeats 40 times	60°C	15 сек	Acquiring to Cycle A on Green, Yellow
	95°C	5 сек	Don't acquire

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

4. Установите оптимизацию (Gain optimisation → Optimise acquiring → Perform optimization before 1st acquisition):
 - Для канала Yellow установите параметры Min Reading – 5Fl и Max Reading 10Fl;
 - Для канала Green установите параметры Min Reading – 15Fl и Max Reading 20Fl.
5. В окне Summary проверьте корректность настроек и запустите амплификацию (Start run).
6. После запуска ПЦР, отредактируйте положение микропробирок в роторе (Edit samples...). Номера строк в списке образцов соответствуют номерам ячеек амплификатора.
7. После завершения амплификации проведите анализ результатов по каждому каналу в отдельности (Analysis → Quantitation → Cycling A. Yellow (Green) → Show).
8. 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%
9. 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 КО+. См. рис. 2. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом «Анализ результатов» данной инструкции

Рисунок 2. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для КО+.

