



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для идентификации гена SRY плода в крови
матери «ДНК-пол ребенка» и «ДНК-пол ребенка плюс»**

(вариант на 30 определений)

ТУ 9398-001-64943561-2010

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для определения пола плода по крови беременной женщины методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из плазмы крови.

Принцип действия:

Выявление ДНК гена половой принадлежности (SRY) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа:

1. Выделение ДНК из исследуемого материала
2. ПЦР-амплификацию ДНК с одновременной гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится во время прохождения ПЦР
3. Интерпретация результатов.

Выделение ДНК из исследуемого материала проводится с помощью рекомендованной процедуры выделения. Затем с полученными пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков генов SRY и GAPDH в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, и разрушаются Taq-полимеразой, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК гена SRY и гена GAPDH.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Объем выделения, мкл	Методы выделения	Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность
1000	рекомендованный	плазма крови	200 копий/мл
2000	рекомендованный	плазма крови	50 копий/мл

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Срок годности: 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортировка: набор реагентов транспортировать при температуре от минус 18°C до минус 25°C. Допускается транспортировка при температуре от 2°C до 8°C не более трех суток.

Хранение: набор реагентов хранить при температуре от минус 18°C до минус 25°C.

Условия отпуска: для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

**Состав набора реагентов
(вариант «ДНК-пол ребенка»)**

Реактив	Объем, мл
	30 тестов
Смесь для ПЦР SRV	0,72
Смесь для ПЦР GAPDH	0,29
Тақ-полимераза	0,06
Мужская контрольная ДНК (ПКО)	0,58
Деионизованная вода	1,2

**Состав набора реагентов
(вариант «ДНК-пол ребенка плюс»)**

Реактив	Объем, мл
	30 тестов
Смесь для ПЦР	1,00
Смесь праймеров SRV	0,72
Смесь праймеров GAPDH	0,29
Мужская контрольная ДНК (ПКО)	0,43
Деионизованная вода	0,86

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

1. Удалять неиспользованные реактивы 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.

2. Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

3. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

4. Не использовать набор по истечению срока годности.

5. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

6. Все компоненты наборов в используемых концентрациях являются нетоксичными.

7. Все исследуемые биологические образцы следует рассматривать как инфекционно-опасные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов В и С, других возбудителей.

8. Манипуляции по выделению ДНК следует проводить в отдельном помещении в специальной лабораторной одежде и одноразовых резиновых перчатках. Для очистки рабочих поверхностей необходимо использовать дезинфицирующие растворы после каждого цикла выделения ДНК.

Чувствительность метода ПЦР позволяет исследовать минимальные количества ДНК, поэтому опасность случайного загрязнения образцов чужеродной ДНК вызывает серьезные опасения. Во избежание контаминации исследуемых образцов и компонентов наборов на различных стадиях анализа соблюдайте следующие меры предосторожности:

- Основные три этапа работ – (I) подготовка исследуемых образцов, включая выделение ДНК; (II) подготовка образцов для ПЦР; (III) проведение ПЦР – должны быть физически изолированы, то есть, размещены в разных помещениях.

- Все лабораторное оборудование (в том числе пипетки, штативы, посуда, пластик, рабочие растворы) должно быть строго стационарным и

промаркировано по принадлежности к соответствующей рабочей зоне. Запрещается перемещение оборудования из одной рабочей зоны в другую.

- Исследуемые образцы ДНК должны храниться в соответствующей зоне, отдельно от компонентов наборов для ПЦР.
- Подготовку образцов для ПЦР следует проводить в ламинарном боксе, с использованием специального комплекта пипеток и наконечников с аэрозольными фильтрами. Поверхности рабочих столов, на которых производится постановка ПЦР, должны обязательно облучаться ультрафиолетом в течение 20-30 минут до начала и после окончания работ.
- При подготовке ПЦР необходимо работать в перчатках, все наконечники и пробирки на этой стадии используются только однократно.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. ПЦР-бокс (например «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл, до 100 мкл, до 20 мкл, до 10 мкл. (например, «Ахуген», США).
5. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5(0,2) мл. (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
6. Холодильник от 2°C до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16°C
7. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
9. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gine» 3000 или 6000 («Corbett Reserach», Австрия) или амплификатор планшетного типа, например, «IQ5» («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США) или эквивалентные.
10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок-для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gine»).
 - б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «IQ5», «Mx3000P»).

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

Для проведения анализа используется плазма периферической крови.

Образец должен доставляться в лабораторию в течение 16-24 часов после взятия материала (рекомендуется максимально ускорять доставку и осуществлять ее на льду или в термоконтнерах при температуре плюс 4°C).

Для получения плазмы кровь (не менее 8-10 мл) отбирают в пробирку с ЭДТА. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 24 часов (предпочтительно в течение первых двух часов) с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 10 мин при 1600 g, после чего аккуратно отбирают верхний слой плазмы и переносят его в отдельную одноразовую пробирку, избегая попадания в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами. Плазму центрифугируют 10 минут при 16000 g и вновь отбирают верхний слой в отдельную пробирку, не затрагивая осадка на дне

пробирки. Полученную плазму можно использовать для выделения ДНК или заморозить при температуре не выше минус 70°C для дальнейшего использования. Выделять ДНК следует не менее чем из 1,5 мл плазмы (рекомендуется 2 мл) и растворять в конечном объеме 65-70 мл (50-55 мкл для наборов «плюс»).

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
2. Проведение амплификации с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»
3. Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- «ПРОБА-НК-ФЕТ» (ООО «НПО ДНК-Технология ТС», Россия)
- «ДНК-сорб-Б» («ИнтерЛабСервис», Россия)
- NucleoSpin Blood L (MACHEREY-NAGEL, Германия)
- NucleoSpin® Blood (MACHEREY-NAGEL, Германия)
- QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAamp, Германия)
- QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAamp, Германия)

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!!!

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNAse-free».

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации.

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора. Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетным таблицам.

1. Подготовить пробирки: на каждый тестируемый образец берется одна пробирка GAPDH и три пробирки SRY. Тип пробирок, стрипов выбрать в зависимости от используемого прибора. Положительный и отрицательный контроли ставятся на всю постановку.

2. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.

3. После размораживания тщательно перемешать содержимое пробирок (встряхнув пробирки на вортексе в течение нескольких секунд или же перевернув 10 раз), стряхнуть содержимое пробирок на дно на центрифуге.

4. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельных стерильных пробирках смешать из расчета на одну реакцию все необходимые компоненты. Необходимо использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

5. При работе с малыми объемами вязких жидкостей (таких как Taq-полимераза) рекомендуется готовить микс для 5-10 реакций, чтобы отбирать автоматической пипеткой не менее 1 мкл жидкости. Отбирайте из пробирки нужный объем, не опуская наконечник глубоко в реагент, чтобы не отобрать избыточный объем фермента за счет его попадания на внешнюю поверхность наконечника.

Пробоподготовка

I. Для наборов «стандарт».

1) На одну реакцию амплификации гена **GAPDH** необходимо:

- смесь для ПЦР GAPDH - 4 мкл;

- Taq-полимераза – 0,2 мкл;

В отдельной пробирке приготовить микс из смеси для ПЦР GAPDH и Taq-полимеразы из расчета по одной пробирке на пациента плюс отрицательный контроль и запас одной реакции на погрешность пипетирования. Аккуратно перемешать. Добавить в реакционные пробирки по 4,2 мкл готового микса.

Добавить 15,8 мкл выделенной ДНК (для тестовых пробирок), 15,8 мкл деионизованной воды (для отрицательного контроля).

2) На одну реакцию амплификации гена **SRY** необходимо:

- смесь для ПЦР SRY – 4 мкл;

- Taq-полимераза – 0,2 мкл;

В отдельной пробирке приготовить микс из смеси для ПЦР SRY и Taq-полимеразы из расчета по три пробирки на пациента, положительный, отрицательный контроль и запас одной реакции на погрешность пипетирования. Аккуратно перемешать. Добавить в реакционные пробирки по 4,2 мкл готового микса.

Добавить 15,8 мкл выделенной ДНК (для тестовых пробирок), 15,8 мкл деионизованной воды (для отрицательного контроля) и 15,8 мкл мужской контрольной ДНК.

II. Для наборов серии «плюс».

1) На одну реакцию амплификации гена **GAPDH** необходимо:

- смесь праймеров GAPDH - 4 мкл;

- смесь для ПЦР – 4 мкл;

В отдельной пробирке приготовить микс из смеси праймеров GAPDH и смеси для ПЦР из расчета по одной пробирке на пациента плюс отрицательный контроль и запас одной реакции на погрешность пипетирования. Аккуратно перемешать. Добавить в реакционные пробирки по 8 мкл готового микса.

Добавить 12 мкл выделенной ДНК (для тестовых пробирок), 12 мкл деионизованной воды (для отрицательного контроля).

2) На одну реакцию амплификации гена **SRY** необходимо:

- смесь праймеров SRY – 4 мкл;

- смесь для ПЦР – 4 мкл;

В отдельной пробирке готовится микс из смеси праймеров SRY и смеси для ПЦР из расчета по три пробирки на пациента, положительный, отрицательный контроль и запас одной реакции на погрешность пипетирования. Аккуратно перемешать. Добавить в реакционные пробирки по 8 мкл готового микса.

Добавить 12 мкл выделенной ДНК (для тестовых пробирок), 12 мкл деионизованной воды (для отрицательного контроля) и 12 мкл мужской контрольной ДНК.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».

1. Установить пробирки в реакционный модуль.

Пример расположения реакционных пробирок:

GAPDH Образец 1	SRY Образец 1	SRY Образец 1	SRY Образец 1	SRY ПКО
GAPDH Образец 2	SRY Образец 2	SRY Образец 2	SRY Образец 2	SRY ОКО
GAPDH Образец 3	SRY Образец 3	SRY Образец 3	SRY Образец 3	GAPDH ОКО

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации

Шаг	Цикл	Температура, °C	Время, сек.	Количество циклов
1	1	95	300	1
2	2	94	10	60
3		62	50 Детекция флуоресц. сигнала	

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала после третьего шага.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по одному каналу:

- по каналу **FAM/Green** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации SRY и GAPDH.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Интерпретация результатов в исследуемых образцах.

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК гена половой принадлежности обнаружена, если для данной пробы сигналы по каналу FAM во всех трех пробирках SRY выше установленного порогового значения, и сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH выше установленного порогового значения (Рис.1)
- ДНК гена половой принадлежности не обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирках SRY ниже установленного порогового значения, а сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH выше установленного порогового значения (Рис.2).
- Результат анализа невалидный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH ниже установленного порогового значения.

Если для пробы получен невалидный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из плазмы.

- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы значение порогового цикла «Сt» для сигнала по каналу FAM в пробирке SRY более 45 (Рис.4).
- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в одной пробирке SRY выше установленного порогового значения (Рис.5).

Если для пробы получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными (рекомендуется провести дополнительное исследование пациента через несколько недель). При получении отрицательного результата по этим образцам – результат считается сомнительным

- Набор непригоден к дальнейшему использованию, если сигнал по каналу FAM в пробирке ПКО SRY ниже установленного порогового значения и этот результат устойчиво воспроизводится.

Интерпретация результатов в контрольных образцах.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательных контролей амплификации и положительных контролей амплификации.

Результат по уровню флуоресценции			Результат	Примечание
Канал FAM(SRY)	Канал FAM (GAPDH)	Канал FAM (ПКО SRY)		
Выше порогового значения	Выше порогового значения	Выше порогового значения	ДНК гена половой принадлежности обнаружена	В пробе выявлена ДНК гена половой принадлежности

Ниже порогового значения	Выше порогового значения	Выше порогового значения	ДНК гена половой принадлежности не обнаружена	В пробе не выявлена ДНК гена половой принадлежности
Выше порогового значения (>45 цикла)	Выше порогового значения	Выше порогового значения	Сомнительный	Проба требует повторного тестирования
	Ниже порогового значения		Невалидный	Проба требует повторного выделения и тестирования
		Ниже порогового значения		Допущены ошибки при проведении реакции или набор непригоден для использования

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Этап	Сигнал по каналу FAM	Результат
ОКО	ПЦР	Ниже порогового значения	«ОК»
		Выше порогового значения	Контаминация геномной ДНК или продуктами ПЦР

Анализ кривых флуоресценции.

В состав диагностических наборов введен положительный контроль концентрацией 1000 копий ДНК на одну реакционную смесь. При анализе кривых флуоресценции следует учитывать, что косвенным показателем качества процедуры выделения и достаточности взятого для анализа объема является положение кривой амплификации гена GAPDH относительно кривой ПКО: значение порогового цикла для кривой GAPDH не должно превышать значения такового для ПКО более чем на 2-3 цикла (рис.1,2). Большое отличие (5 циклов и более) означает серьезные потери на этапе выделения, что ведет к уменьшению количества плодной ДНК в реакционной смеси ниже предела чувствительности тест-системы и к возможному появлению ложноотрицательных результатов (рис. 3)

Типичные графики флуоресценции приведены ниже:

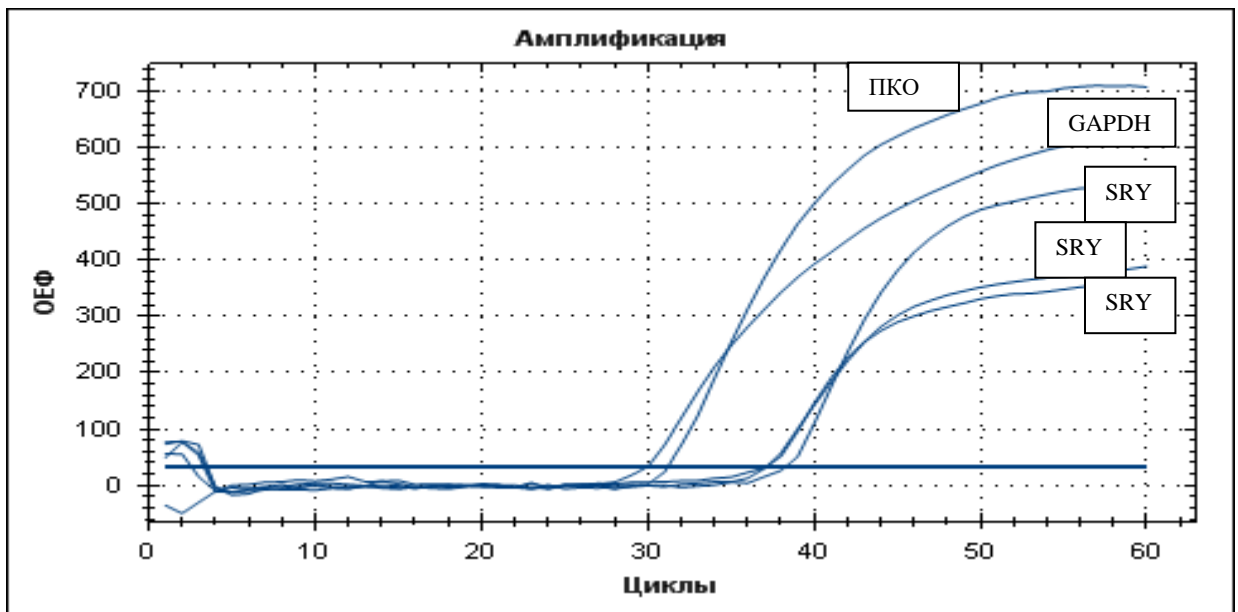


Рис.1. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Результат анализа – пол мужской

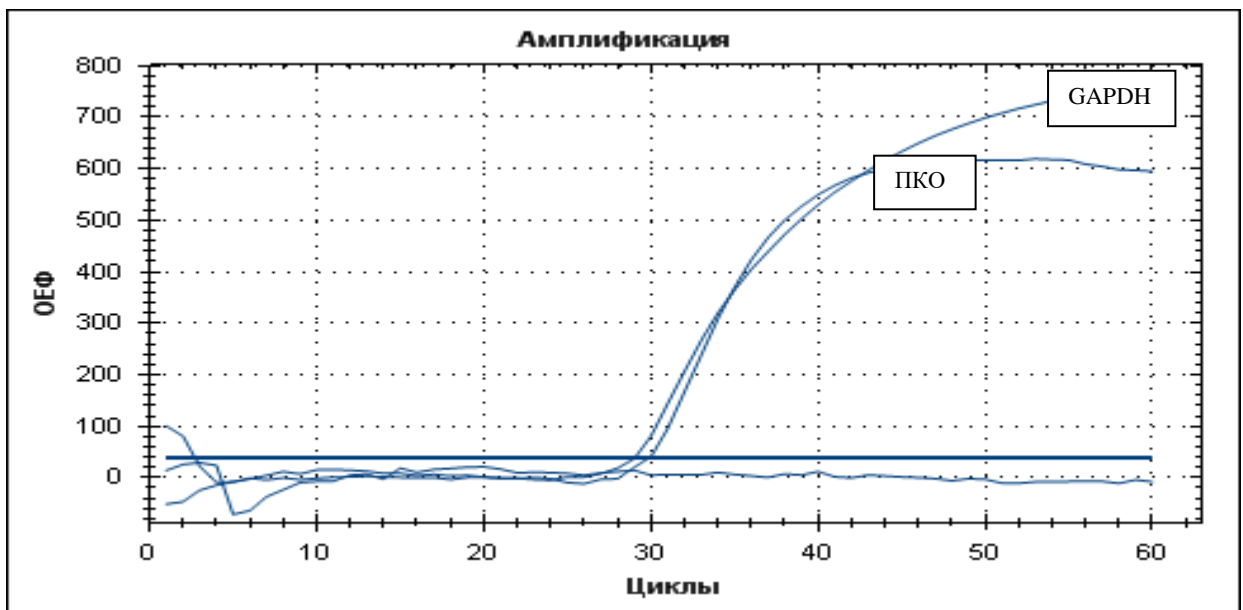


Рис.2. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Результат анализа – ген SRY не выявлен, с вероятностью 98% пол плода – женский.

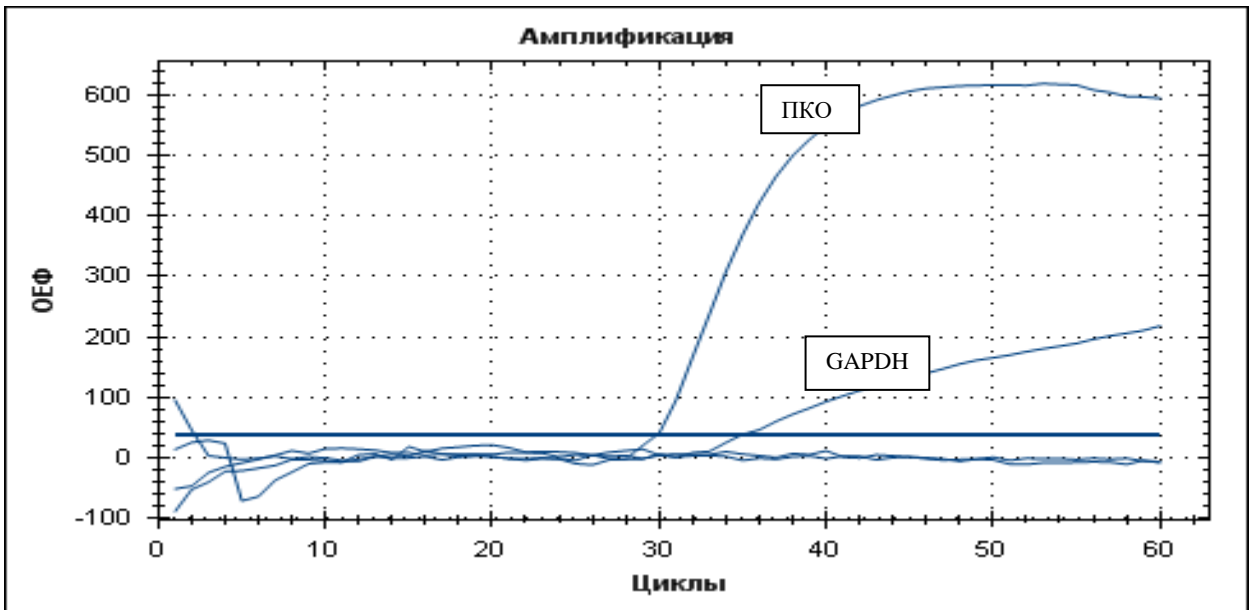


Рис.3. Пример кривых флуоресценции для анализа недостаточного количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Вероятно появление ложноотрицательного результата, концентрация ДНК плода находится за пределами чувствительности тест-системы (C_t для GAPDH более 35 циклов). Результат анализа сомнительный, необходимо выделение ДНК из большего количества плазмы.

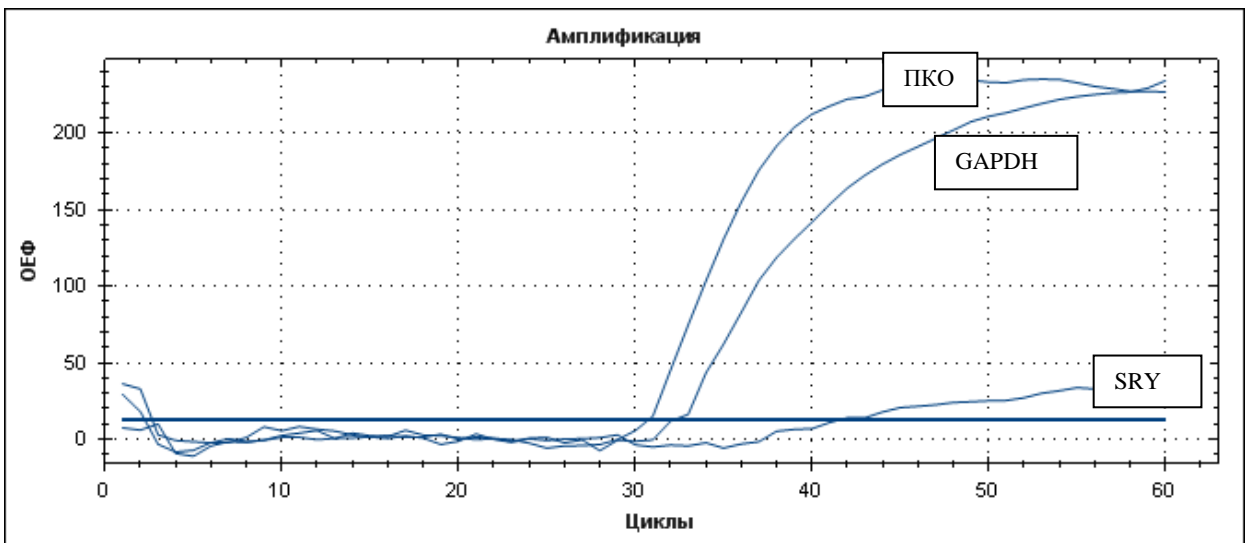


Рис.4. Результат анализа сомнительный. Проба требует повторного выделения и тестирования.

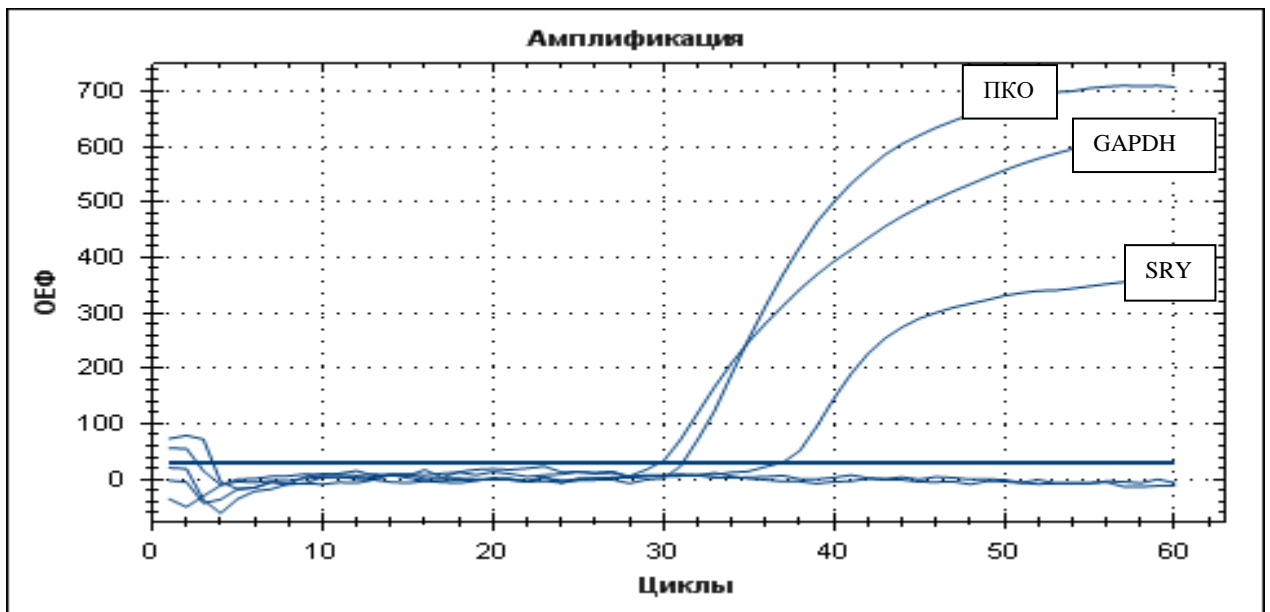


Рис.5. Результат анализа сомнительный. Проба требует повторного выделения и тестирования.