Инструкция

по применению набора для выявления полиморфизмов в генах BRCA1, BRCA2, CHEK2, и FGFR2 и TP53 человека, связанных с генетической предрасположенностью к раку молочной железы и яичников, методом пиросеквенирования на приборах серии PyroMark

“Allel Рак молочной железы и яичников”

Кат. номер: 6-Al-17

Исследуемые полиморфизмы

BRCA1 (185DelAG)
BRCA1 (5382InsC)
BRCA1 (4153DelA)
BRCA1 (A1708E/V)
BRCA1 (Arg1699Trp)
BRCA1 (C61G)
BRCA2 (6174DelT)
BRCA2 (Asn372His)
BRCA2 (Asn991Asp)
CHEK2 (Ile157Thr)
CHEK2 (1-bp Del)
CHEK2 (Pro85Leu)
CHEK2 (Arg181His)
CHEK2 (Glu239Lys/Ter)
CHEK2 (Arg181Cys)
FGFR2 (rs1219648)
FGFR2 (rs2981578)
FGFR2 (rs7895676)
FGFR2 (rs2981582)
FGFR2 (rs3135718)
FGFR2 (rs2981579)
TP53 (Arg72Pro)

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Список сокращений 3
2. Назначение 3
3. Принцип метода 3
3.1. Этапы анализа генетических полиморфизмов методом пиросеквенирования 4
4. Состав набора 4
5. Меры предосторожности 5
5.1. Требования при работе с набором реагентов: 5
5.2. Требования к персоналу 6
6. Дополнительные материалы и оборудование (не входящие в состав набора): 6
6.1. Дополнительные реагенты и оборудование для выделения ДНК и проведения амплификации: 6
7. Выделение ДНК из исследуемых образцов 7
8. Проведение амплификации ДНК 7
8.1. Подготовка реакционной смеси для амплификации 7
8.2. Расчет реагентов для приготовления амплификационной смеси. 8
8.3. Алгоритм приготовления реакционной смеси для проведения амплификации 8
8.4. Запуск программы амплификации 9
9. Проведение пиросеквенирования 9
9.1. Настройка тестов на приборах PyroMark Q24 и PyroMark Q96 ID 9
9.2. Создание макета эксперимента 11
9.3. Иммобилизация ПЦР-продукта после амплификации 11
9.4. Подготовка планшета для пиросеквенирования 12
9.5. Пробоподготовка образцов для пиросеквенирования с использованием вакуумной рабочей станции 13
9.6. Подготовка картриджа 13
9.7. Запуск программы пиросеквенирования на приборе 14
10. Анализ и интерпретация результатов 14
10.1. Примеры пирограмм анализируемых полиморфизмов 14
11. Условия транспортирования, хранения и использования набора реагентов 24
12. Порядок подачи рекламаций 24

1. Список сокращений

ДНК- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА – иммуноферментный анализ
ОКО – отрицательный контрольный образец
rs – reference SNP (идентификационный номер полиморфизма в открытой базе данных dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=)
GenBank - открытая база данных последовательностей ДНК, РНК и белков (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/)
ПЦР – полимеразная цепная реакция

2. Назначение

Набор реагентов «Рак молочной железы и яичников» предназначен для высокоточного определения 22 полиморфизмов (BRCA1 (185DelAG), BRCA1 (5382InsC), BRCA1 (4153DelA), BRCA1 (A1708E/V), BRCA1 (Arg1699Trp), BRCA1 (C61G), BRCA2 (6174DelT), BRCA2 (Asn372His), BRCA2 (Asn991Asp), CHEK2 (Ile157Thr), CHEK2 (1-bp Del), CHEK2 (Pro85Leu), CHEK2 (Arg181His), CHEK2 (Glu239Lys/Ter), CHEK2 (Arg181Cys), FGFR2 (rs1219648), FGFR2 (rs2981578), FGFR2 (rs7895676), FGFR2 (rs2981582), FGFR2 (rs3135718), FGFR2 (rs2981579), TP53 (Arg72Pro), связанных с риском развития рака молочной железы и яичников с помощью технологии пиросеквенирования.

3. Принцип метода

Пиросеквенирование – это метод секвенирования, основанный на исследовании уже известных точечных мутаций путем сравнения с контрольной последовательностью ДНК (reference SNP, rs) из существующей базы данных (Genbank). В ходе реакции пиросеквенирования происходит синтез второй цепи ДНК на матрице одноцепочечной ДНК, меченной биотином. Высвобождающийся в процессе синтеза пирофосфат, вовлекается в каскад ферментативных реакций, в результате которых происходит испускание видимого света. Интенсивность свечения регистрируется CCD-камерой и на графике (пирограмме) отображается в виде пиков. Высота пиков пропорциональна количеству встроившихся в матрицу нуклеотидов. Схема реакций пиросеквенирования представлена на рисунке 1.

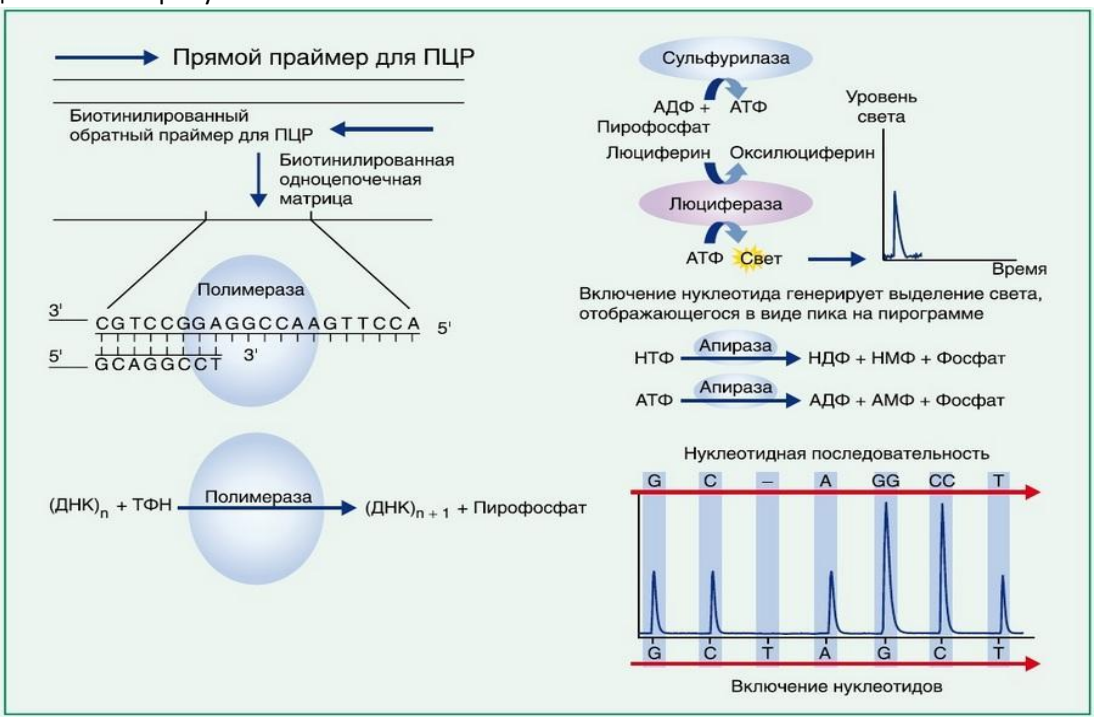


Рисунок 1. Схема реакции пиросеквенирования.

3.1. Этапы анализа генетических полиморфизмов методом пиросеквенирования

3.1.1. Выделение ДНК из образцов клинического материала.

3.1.2. Проведение реакции амплификации участка ДНК, содержащего анализируемый генетический полиморфизм.
Реакция амплификации проводится с использованием специфических для конкретного анализируемого полиморфизма праймеров.

3.1.3. Пиросеквенирование продуктов амплификации и анализ полученных результатов.
После проведения амплификации биотинилированный ПЦР-продукт иммобилизируется на покрытые стрептавидином сефарозные частицы (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare). С использованием станции для пробоподготовки Vacuum Prep Workstation проводится серия отмывок, получение одноцепочечного фрагмента ДНК и подготовка к отжигу сиквенсного праймера. После проведения отжига праймера для сиквенса, полученная смесь готова к проведению реакции пиросеквенирующего синтеза с применением системы генетического анализа серии PyroMark.

4. Состав набора

В состав набора входят реагенты для проведения реакции амплификации ДНК (праймеры для ПЦР, Taq-полимераза и ПЦР-буфер, отрицательный контрольный образец-ОКО) и для проведения реакции пиросеквенирования (праймеры для пиросеквенирования). Комплект реагентов для амплификации и пиросеквенирования рассчитан на проведение **50 реакций** для каждого исследуемого полиморфизма. Все реагенты, входящие в состав набора, приведены в таблице 1.

№	Реагент	Полиморфизм	Объем реагента, мл	Количество пробирок, шт.
1	Праймеры для амплификации	BRCA1 (185DelAG)	0,280	1
		BRCA1 (5382InsC)	0,280	1
		BRCA1 (4153DelA)	0,280	1
		BRCA1 (A1708E/V)	0,280	1
		BRCA1 (Arg1699Trp)	0,280	1
		BRCA1 (C61G)	0,280	1
		BRCA2 (6174DelT)	0,280	1
		BRCA2 (Asn372His)	0,280	1
		BRCA2 (Asn991Asp)	0,280	1
		CHEK2 (Ile157Thr)	0,280	1
		CHEK2 (1-bp Del)	0,280	1
		CHEK2 (Pro85Leu)	0,280	1
		CHEK2 (Arg181His) и CHEK2 (Arg181Cys)*	0,280	1
		CHEK2 (Glu239Lys/Ter)	0,280	1
		FGFR2 (rs1219648)	0,280	1
		FGFR2 (rs2981578)	0,280	1
		FGFR2 (rs7895676)	0,280	1
		FGFR2 (rs2981582)	0,280	1
		FGFR2 (rs3135718)	0,280	1
		FGFR2 (rs2981579)	0,280	1
		TP53 (Arg72Pro)	0,280	1
2	Праймеры для секвенирования	BRCA1 (185DelAG)	0,220	1
		BRCA1 (5382InsC)	0,220	1

		BRCA1 (4153DelA)	0,220	1
		BRCA1 (A1708E/V)	0,220	1
		BRCA1 (Arg1699Trp)	0,220	1
		BRCA1 (C61G)	0,220	1
		BRCA2 (6174DelT)	0,220	1
		BRCA2 (Asn372His)	0,220	1
		BRCA2 (Asn991Asp)	0,220	1
		CHEK2 (Ile157Thr)	0,220	1
		CHEK2 (1-bp Del)	0,220	1
		CHEK2 (Pro85Leu)	0,220	1
		CHEK2 (Arg181His) и CHEK2 (Arg181Cys)*	0,220	1
		CHEK2 (Glu239Lys/Ter)	0,220	1
		FGFR2 (rs1219648)	0,220	1
		FGFR2 (rs2981578)	0,220	1
		FGFR2 (rs7895676)	0,220	1
		FGFR2 (rs2981582)	0,220	1
		FGFR2 (rs3135718)	0,220	1
		FGFR2 (rs2981579)	0,220	1
		TP53 (Arg72Pro)	0,220	1
3	Отрицательный контрольный образец (ОКО)		2,0	1
4	ПЦР-буфер		2,0	6
5	Taq-полимераза (5 ед/мкл)		0,315	2

Таблица 1. Комплект реагентов для амплификации и пиросеквенирования рассчитан на проведение 50 реакций для каждого исследуемого полиморфизма.

* - Внимание!!!Полиморфизмы CHEK2 (Arg181His) и CHEK2 (Arg181Cys) расположены близко друг к другу, поэтому оба полиморфизма анализируются одновременно. Для анализа используется один и тот же ампликон, а реакция пиросеквенирования проходит с одного сиквенсного праймера.

5. Меры предосторожности

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5.1. Требования при работе с набором реагентов:

Набор предназначен только для использования в научно-исследовательских целях на территории РФ и не предназначен для медицинских целей.

- Применять набор строго по назначению и согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10

«Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

5.2. Требования к персоналу

Набор реагентов предназначен для использования специалистами не моложе 18 лет, имеющими соответствующее профильное образование (высшее или средние медицинское, биологическое или иное образование, подготовленные на рабочем месте или получившие дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

6. Дополнительные материалы и оборудование (не входящие в состав набора):

6.1. Дополнительные реагенты и оборудование для выделения ДНК и проведения амплификации:

1. Комплект реагентов для выделения ДНК из образцов цельной крови (любые коммерческие наборы, обеспечивающие получение качественных образцов ДНК, соответствующих требованиям см. в п.7);
2. Бокс антибактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс);
3. Вортекс;
4. Твердотельный термостат;
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» ёмкостью 1.5-2 мл, развивающая ускорение до 14000 g;
6. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 0.2, 1.5 и 2 мл;
7. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема;
8. Одноразовые стерильные наконечники с фильтром до 10 мкл, 20 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл в штативах;
9. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл, 0,5 мл и 1,5 (2) мл;
10. Холодильник, поддерживающий температуру от + 2 до +8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С, для хранения выделенных проб ДНК и Taq-полимеразы;
11. Емкость для сброса наконечников;
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09;
13. Программируемый амплификатор (валидированы амплификаторы T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), Mastercycler gradient (Eppendorf));
14. Спектрофотометр или аналогичный прибор для измерения концентрации ДНК;
15. Минеральное масло для ПЦР (в случае если используемый амплификатор не поддерживает функцию «нагрева крышки»).

6.2. Дополнительные реагенты и оборудование для реакции пиросеквенирования ДНК – согласно инструкции, к комплекту реагентов для пиросеквенирования (Qiagen):

1. буфер для отжига (PyroMark Annealing Buffer; Qiagen);
2. связывающий буфер (PyroMark Binding Buffer; Qiagen);
3. денатурирующий раствор (PyroMark Denaturation Solution; Qiagen);
4. вода без нуклеаз
5. этанол 70%
6. набор реагентов для пиросеквенирования (PyroMark Gold Q24 Reagents или PyroMark Gold Q96 Reagents; Qiagen);
7. картридж для секвенатора (PyroMark Q24 Cartridge или PyroMark Q96 Cartridge, Qiagen);

8. планшеты для секвенирования (PyroMark Q24 Plate Low или PyroMark Q96 Plate Low; Qiagen);
9. термостатируемый держатель для плашек (PyroMark Q24 Sample Prep Thermoplate Low или PyroMark Q96 Sample Prep Thermoplate Low; Qiagen);
10. вакуумная станция для пробоподготовки (PyroMark Q24 Vacuum Workstation 220V; или PyroMark Q96 Vacuum Workstation 220V Qiagen);
11. промывочный буфер (PyroMark Wash Buffer; Qiagen);
12. ванночки для вакуумной станции (PyroMark Q24 Vacuum Prep Troughs или PyroMark Q96 Vacuum Prep Troughs; Qiagen);
13. планшеты для ИФА, 96-луночные, плоское дно, прозрачные;
14. стрептавидин-сефароза (GE Healthcare);
15. пиросеквенатор PyroMark Q24 (Qiagen) или PyroMark Q96 ID (Qiagen);
16. Шейкер для планшетов со скоростью вращения не ниже 1400 об/мин.;
17. Вортекс;
18. Воздушный или твердотельный термостат;
19. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема;
20. Одноразовые стерильные наконечники с фильтром до 10 мкл, до 20 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл в штативах;
21. Штативы (универсальные для всех типов пробирок);
22. Холодильник-морозильник медицинский, от 2 до 8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
23. Контейнер для отходов;
24. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

7. Выделение ДНК из исследуемых образцов

Выделение ДНК из биоматериала допустимо с использованием коммерческих наборов или методик, согласно инструкции производителя. Для постановки отрицательного контрольного образца выделения ДНК, в качестве пробы при выделении ДНК из биологического материала, рекомендуется использовать раствор ОКО, который входит в состав набора (см. таблицу 1 п.4).
После выделения необходимо измерить концентрацию полученной ДНК спектрофотометрически. Чистота препарата ДНК определяется по соотношению оптической плотности раствора при 260 нм и 280 нм. Соотношение 260/280 должно составлять не менее 1,8. Спектр должен иметь максимум при 260 нм.
Для проведения амплификации и пиросеквенирования оптимальная рабочая концентрация ДНК составляет **10 - 15 нг/мкл.** Для приготовления разведений ДНК рекомендуется использовать воду без нуклеаз или ТЕ-буфер.

8. Проведение амплификации ДНК

8.1. Подготовка реакционной смеси для амплификации

Для постановки амплификации используется ДНК с концентрацией 10-15 нг/мкл.
За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси, необходимо извлечь реагенты для амплификации (праймеры для амплификации, ПЦР-буфер) из морозильника, разморозить содержимое (кроме фермента Taq-полимеразы, ее необходимо доставать из холодильника непосредственно перед добавлением в реакционную смесь).
Реагенты перемешать на Вортекс и осадить капли краткосрочным центрифугированием.
Подготовить и промаркировать пробирки для приготовления амплификационных смесей по числу и виду определяемых полиморфизмов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора. Оптимальными являются полипропиленовые пробирки емкостью до 0,2 мл с плотно закрывающейся крышкой (например, Axygen PCR tubes) Для внесения в

пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используют одноразовые наконечники с фильтрами.

8.2. Расчет реагентов для приготовления амплификационной смеси.

Общий объем амплификационной смеси на одну точку (1 полиморфизм) – 20 мкл
Объем смеси (ПЦР-буфер и Taq-полимераза) – 10 мкл
Объем раствора соответствующего праймера для амплификации – 5 мкл
Объем раствора ДНК (конц. 10-15 нг/мкл) – 5 мкл

В таблице 2 приведен расчет количества реагентов, для приготовления смеси для амплификации на 1 реакцию и несколько реакций. Рекомендуется делать запас (N+1, где N-количество проб).

Кол-во проб	ПЦР-буфер, мкл	Taq-полимераза, мкл	Кол-во проб	ПЦР-буфер, мкл	Taq-полимераза, мкл
1	10	0,5	26	260	13,0
2	20	1,0	27	270	13,5
3	30	1,5	28	280	14,0
4	40	2,0	29	290	14,5
5	50	2,5	30	300	15,0
6	60	3,0	31	310	15,5
7	70	3,5	32	320	16,0
8	80	4,0	33	330	16,5
9	90	4,5	34	340	17,0
10	100	5,0	35	350	17,5
11	110	5,5	36	360	18,0
12	120	6,0	37	370	18,5
13	130	6,5	38	380	19,0
14	140	7,0	39	390	19,5
15	150	7,5	40	400	20,0
16	160	8,0	41	410	20,5
17	170	8,5	42	420	21,0
18	180	9,0	43	430	21,5
19	190	9,5	44	440	22,0
20	200	10,0	45	450	22,5
21	210	10,5	46	460	23,0
22	220	11,0	47	470	23,5
23	230	11,5	48	480	24,0
24	240	12,0	49	490	24,5
25	250	12,5	50	500	25,0

Таблица 2. Расчет количества компонентов смеси для амплификации.

8.3. Алгоритм приготовления реакционной смеси для проведения амплификации

8.3.1. Смешать в отдельной пробирке 10*(N+1) мкл ПЦР-буфера и 0.5*(N+1) мкл Taq-полимеразы;
8.3.2. Перемешать смесь на Вортекс, осадить капли краткосрочным центрифугированием и раскапать по 10 мкл в пробирки, в которых будет проводится амплификация.
8.3.3. В каждую пробирку, содержащую буфер и полимеразу добавить по 5 мкл ДНК (рабочая концентрация 10-15 нг/мкл).

8.3.4. В каждую пробирку содержащую буфер, полимеразу и ДНК, добавить 5 мкл праймера для амплификации исследуемого полиморфизма

8.3.5. Если используемый амплификатор не имеет функции нагрева крышки, то сверху к ПЦР-смеси добавить каплю минерального масла для ПЦР (не входит в комплект).

8.3.6. В качестве отрицательного контроля по каждому исследуемому полиморфизму требуется поставить отрицательный контроль (в качестве отрицательного контроля использовать ОКО, полученный при выделении ДНК).

8.4. Запуск программы амплификации

Для проведения амплификации допустимо использование программируемых амплификаторов T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), Mastercycler gradient (Eppendorf). В случае использования амплификаторов других моделей, требуется провести валидацию программы амплификации.
Перед запуском прибора необходимо прописать на нем программу амплификации, в соответствии с таблицей 3.

Этап	Температура	Время	Кол-во циклов
Инкубация	95ºC	3 мин	1
Денатурация	95ºC	30 сек	37
Отжиг праймеров	60ºC	25 сек	
Элонгация	72ºC	1 мин	
Инкубация	72ºC	3 мин	1

Таблица 3.Программа амплификации

После окончания программы амплификации полученные ПЦР-продукты следует использовать для дальнейшего проведения пиросеквенирования. Допустимо краткосрочное хранение продуктов амплификации (до 7 дней) при температуре +2…+8^{0}C или долгосрочное хранение (до 1 месяца) при -20^{0}C.

9. Проведение пиросеквенирования

9.1. Настройка тестов на приборах PyroMark Q24 и PyroMark Q96 ID

Для проведения реакции пиросеквенирования необходимо внести нуклеотидные последовательности изучаемых генов (см. Таблицу 4), задать название теста и сохранить тест, используя программное обеспечение PyroMark Q24 2.0.6 или PyroMark Q96 2.5.7.

9.1.1. Запустить программное обеспечение PyroMark Q24 2.0.6 или PyroMark Q96 2.5.7.;

9.1.2. В меню *File* выбрать вкладку *New Assay*, в ней выбрать пункт *AQ* Assay (PyroMark Q24) и *SNP Assay* (PyroMark Q96);

9.1.3. В поле *Sequence to Analyze* внести соответствующую последовательность нуклеотидов (см. Таблицу 4);

9.1.4. В поле *Dispensation Order* внести соответствующую последовательность нуклеотидов, обозначающий порядок добавления нуклеотидов в процессе пиросеквенирования (см. Таблицу 4);

9.1.5. Дать название и сохранить тест, выбрав в меню *File* вкладку *Save as*.

9.1.6. Закрыть окно для настройки теста.

Исследуемый полиморфизм	**Последовательность для анализа (Sequence to analyze)**	**Порядок добавления нуклеотидов (Dispensation Order)**	**Тип сиквенсного праймера**	**Варианты генотипа**
BRCA1 (185DelAG)	AAAATCTT[AG]AGTG	CAATCGTAGAGTG	Прямой	Ins/Ins Ins/Del Del/Del
BRCA1 (5382InsC)	[G]ATTCTCTTG	CGATCTC	Обратный	Ins/Ins Ins/Del Del/Del
BRCA1 (4153DelA)	GATG[A]AGAAAG	TGATCGAGAG	Прямой	Ins/Ins Ins/Del Del/Del
BRCA1 (A1708E/V)	G/TCAATTCCT	CGTCATCT	Обратный	G/G G/T T/T
BRCA1 (Arg1699Trp)	C/TGGACAC	GCTGACAC	Прямой	C/C C/T T/T
BRCA1 (C61G)	HCTGTGAAGG	GATCTGTGA	Обратный	A/A A/C A/T C/T C/C T/T
BRCA2 (6174DelT)	CC[A]CTTGCTG	GCACTGCTG	Обратный	Ins/Ins Ins/Del Del/Del
BRCA2 (Asn372His)	CAA/CATCAG	GCACATCAG	Прямой	A/A A/C C/C
BRCA2 (Asn991Asp)	TC/TCATGTAA	GTCATGTA	Обратный	C/C C/T T/T
CHEK2 (Ile157Thr)	ATGCAA/GTGT	GATGTCAGTGT	Обратный	A/A A/G G/G
CHEK2 (1-bp Del)	[C]TGATTTTGGGC	GCTGATTGC	Прямой	Ins/Ins Ins/Del Del/Del
CHEK2 (Pro85Leu)	CCTCAA/GGTTCTT	TCTGCAGTCT	Обратный	A/A A/G G/G
CHEK2 (Arg181His) и CHEK2 (Arg181Cys)*	CC/TRTCCTTTGAA	GCTAGTCTGA	Прямой	Arg181His: C/C C/T T/T Arg181Cys A/A A/G G/G
CHEK2 (Glu239Lys/Ter)	CTTTCG/A/TAGAGG	TCTGCGTAGAG	Прямой	A/A A/G A/T G/T G/G T/T

FGFR2 (rs1219648)	CACA/GCTC	GCATCAGCTC	Обратный	A/A A/G G/G
FGFR2 (rs2981578)	CAAACC/TGCA	TCGACTGCA	Обратный	C/C C/T T/T
FGFR2 (rs7895676)	C/T GC A/G CCAC	GCTGTCAGCAC	Обратный	C/C C/T T/T
FGFR2 (rs2981582)	TTGT/CGGAGAG	GTAGCTGAG	Прямой	T/T T/C C/C
FGFR2 (rs3135718)	GCTC/TGGGTTGG	CGACTCGTG	Обратный	C/C C/T T/T
FGFR2 (rs2981579)	A/GCAGAGG	CAGCAGAG	Обратный	A/A A/G G/G
TP53 (Arg72Pro)	C/GGGGGAGCAG	TCGGAGCAG	Обратный	C/C C/G G/G

Таблица 4. Последовательности для анализа исследуемых полиморфизмов.
* - Внимание!!!Полиморфизмы CHEK2 (Arg181His) и CHEK2 (Arg181Cys) расположены близко друг к другу, поэтому оба полиморфизма анализируются одновременно. Для анализа используется один и тот же ампликон, а реакция пиросеквенирования проходит с одного сиквенсного праймера.

9.2. Создание макета эксперимента

9.2.1. В меню *File* выбрать вкладку *New Run*
9.2.2. Заполнить поле *Instrument Method*, данный метод может быть указан на картридже для секвенатора (PyroMark Q24 Cartridge или PyroMark Q96 Cartridge, Qiagen)
9.2.3. В поле *Plate Setup* в верхней строке для каждой используемой ячейки выбрать соответствующий тест для данной пробы для этого в контекстном меню выбрать функцию *Load Assay* и загрузить сохранённую на предыдущем этапе программу для теста, во второй и третьей строке можно указать номер пробы и дополнительную информацию.
9.2.4. Дать название и сохранить макет эксперимента на флеш-карту, выбрав в меню *File* вкладку *Save as.*
9.2.5. Для распечатки макета эксперимента и определения количества необходимых реагентов, для заполнения картриджа, в меню *Tools* выбрать вкладку *Pre Run Information*, после чего появится окно с информацией о количестве нуклеотидов каждого типа и реагентов, которые необходимо заправить в картридж.

9.3. Иммобилизация ПЦР-продукта после амплификации

9.3.1. Перед началом работы необходимо подготовить необходимые реагенты и оборудование, в соответствии с «Руководством по эксплуатации PyroMark Q24» или «Руководством по эксплуатации PyroMark Q96 ID». Реагенты, хранящиеся в холодильнике достать заранее (30 минут), для того чтобы они прогрелись до комнатной температуры.
9.3.2. Расчет количества реагентов, для приготовления смеси для иммобилизации приведен в таблице 5. Рекомендуется брать реагенты с запасом (N+1, где N-количество проб). Смесь для иммобилизации готовится в отдельных пробирках на 1,5 или 2 мл. Флакон с частицами сефарозы перед применением необходимо встряхнуть на Вортексе (частицы сефарозы быстро оседают), для образования однородной взвеси, и отобрать необходимое количество.

9.3.3. В лунки ИФА планшета (согласно макету эксперимента, см. п. 9.2) при работе на приборе PyroMark Q24 добавить по 70 мкл смеси для иммобилизации и 10 мкл ПЦР-продукта. При работе на приборе PyroMark Q96 добавить 65 мкл смеси для иммобилизации и 15 мкл ПЦР-продукта. Поместить подготовленный планшет на шейкер, инкубировать не менее 10 мин. при 1350 об/мин.

Количество проб (N+1)	**Сефароза (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare), мкл**		**Связывающий буфер (Binding buffer, Qiagen), мкл**		**Вода без нуклеаз, мкл**	
	PyroMark Q24	**PyroMark Q96 ID**	**PyroMark Q24**	**PyroMark Q96 ID**	**PyroMark Q24**	**PyroMark Q96 ID**
1	2	3	40	41	28	21
2	4	6	80	82	56	42
3	6	9	120	123	84	63
4	8	12	160	164	112	84
5	10	15	200	205	140	105
6	12	18	240	246	168	126
7	14	21	280	287	196	147
8	16	24	320	328	224	168
9	18	27	360	369	252	189
10	20	30	400	410	280	210
11	22	33	440	451	308	231
12	24	36	480	492	336	252
13	26	39	520	533	364	273
14	28	42	560	574	392	294
15	30	45	600	615	420	315
16	32	48	640	656	448	336
17	34	51	680	697	476	357
18	36	54	720	738	504	378
19	38	57	760	779	532	399
20	40	60	800	820	560	420
21	42	63	840	861	588	441
22	44	66	880	902	616	462
23	46	69	920	943	644	483
24	48	72	960	984	672	504
25	50	75	1000	1025	700	525

Таблица 5. Расчет количества компонентов смеси для иммобилизации.

9.4. Подготовка планшета для пиросеквенирования

1. Праймеры для сиквенса перемешать на Вортексе и сбросить капли краткосрочным центрифугированием.
2. Согласно макету эксперимента (см. п. 9.2.) в лунки планшета для секвенирования при работе на приборе PyroMark Q24 внести буфера для отжига (Annealing Buffer, Qiagen) - 22 мкл и сиквенсного праймера - 3 мкл. При при работе с PyroMark Q96 внести буфера для отжига (Annealing Buffer, Qiagen) - 36 мкл и 4 мкл сиквенсного праймера.

9.5. Пробоподготовка образцов для пиросеквенирования с использованием вакуумной рабочей станции

Подготовить к работе PyroMark Q24 Vacuum Workstation или PyroMark Q96 Vacuum Workstation 220V Qiagen) в соответствии с «Руководством по эксплуатации PyroMark Q24 или PyroMark Q96 ID» и выполнить все описанные там операции по разделению цепей ДНК, отмывке и гибридизации ПЦР-продуктов, иммобилизованных на частицах сефарозы с сиквенсными праймерами.

9.5.1. Подготовить вакуумную станцию для работы. Заполнить пять ванночек соответствующими растворами (примерно 40-50 мл для PyroMark Q24 и 120-180 мл для PyroMark Q96): вода без нуклеаз, этанол 70%, денатурирующий раствор (PyroMark Denaturation Solution; Qiagen) и промывочный буфер (PyroMark Wash Buffer, Qiagen).

9.5.2. Включить вакуумный насос. Открыть вакуумный переключатель. Промыть зонды фильтра, опустив устройство для пробоподготовки в ванночку с водой без нуклеаз, убедится, что вода потекла в контейнер для отходов. Поднять устройство вертикально под углом 90^0, чтобы удалить жидкость с зондов фильтра.

9.5.3. Снять ИФА-планшет с образцами с шейкера и опустить зонды устройства в планшет и полностью отобрать смесь для иммобилизации из ИФА-планшета. Процедуру нужно провести сразу же после снятия планшета с шейкера, так как частицы сефарозы очень быстро осаждаются.

9.5.4. Поместить зонды устройства в ванночку с 70% этанолом и промыть зонды в течении 10 сек. Поднять устройство вертикально под углом 90^0, чтобы удалить жидкость с зондов фильтра.

9.5.5. Поместить зонды устройства в ванночку с денатурирующим раствором и промыть зонды в течении 10 сек. Поднять устройство вертикально под углом 90^0, чтобы удалить жидкость с зондов фильтра.

9.5.6. Поместить зонды устройства в ванночку с однократным промывочным буфером и промыть зонды в течении 10 сек. Поднять устройство вертикально под углом 90^0, чтобы удалить жидкость с зондов фильтра.

9.5.7. Поместить планшет для пиросеквенирования со смесью подготовленных сиквенсных праймеров в соответствующее место на вакуумной станции для пробоподготовки. Держа на весу устройство с фильтрами над планшетом с праймерами, отключить вакуумный переключатель.

9.5.8. Опустить фильтры на дно ячеек планшета и осторожно потрясти устройство несколько раз, чтобы частицы сефарозы оказались в ячейках планшета для пиросеквенирования. Промыть зонды фильтра, опустив устройство для пробоподготовки в ванночку с водой без нуклеаз, открыть вакуумный переключатель, убедиться, что вода потекла в контейнер для отходов. Поднять устройство вертикально под углом 90^0, чтобы удалить жидкость с зондов фильтра.

9.5.9. Для отжига праймеров на одноцепочечной ДНК поместить планшет для пиросеквенирования на разогретый до 80^0C держатель для плашек и инкубировать 2 мин. Снять планшет и дать ему остыть при комнатной температуре несколько минут.

9.6. Подготовка картриджа

9.6.1. Подготовить для работы реагенты PyroMark Q24 Gold Reagents (Qiagen) или PyroMark Q96 Gold Reagents (Qiagen) согласно «Руководству по эксплуатации прибора». Растворить с использованием воды без нуклеаз лиофилизированную смесь ферментов и субстрат, как указано на упаковке. Нуклеотиды перемешать на вортексе и сбросить капли краткосрочным центрифугированием.

9.6.2. Заполнить картридж реагентами (ферменты, субстрат, нуклеотиды) в соответствии с информацией (*Pre Run Information*), полученной при создании макета эксперимента (смотри пункт 9.2.)

9.7. Запуск программы пиросеквенирования на приборе

Провести пиросеквенирование согласно «Руководству по эксплуатации прибора».

9.7.1. Поместить подготовленный картридж в прибор и закрепить его фиксатором.

9.7.2. Поместить остывший планшет для секвенирования в прибор и закрепить его фиксатором.

9.7.3. Вставить в прибор флеш-карту с программой эксперимента. На экране прибора в главном меню выбрать функцию Run, выбрать сохраненную программу эксперимента и нажать Select, подтвердить проведение выбранной программы эксперимента.

10. Анализ и интерпретация результатов

После завершения программы пиросеквенирования, информация о прогоне сохраняется на флеш-карте или в случае с PyroMark Q96 ID сразу выводится на экран компьютера. Работая с PyroMark Q24 необходимо перенести флеш-карту на ПК и открыть файл пробега. Анализ генотипов в исследуемых пробах проводится автоматически при помощи программного обеспечения PyroMark Q24 2.0.6. при нажатии в верхнем правом углу иконки *Analyze All Wells.*

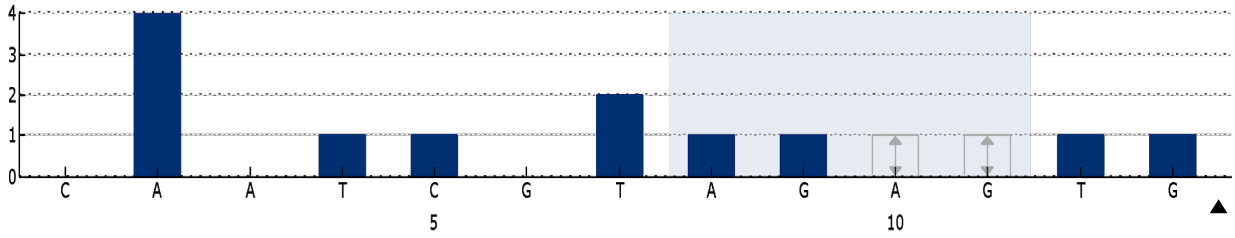
При анализе результатов необходимо учитывать тип сиквенсного праймера (см. таблицу 4). Результатом исследования является определение генотипа по каждому исследуемому генетическому полиморфизму. Примеры пирограмм для полиморфизмов приведены в п. 10.1.

Если в отрицательном контрольном образце определяется нуклеотидная последовательность, соответствующая анализируемому полиморфизму, то результаты анализа считаются недостоверными и исследование следует повторить с этапа амплификации.

10.1. Примеры пирограмм анализируемых полиморфизмов

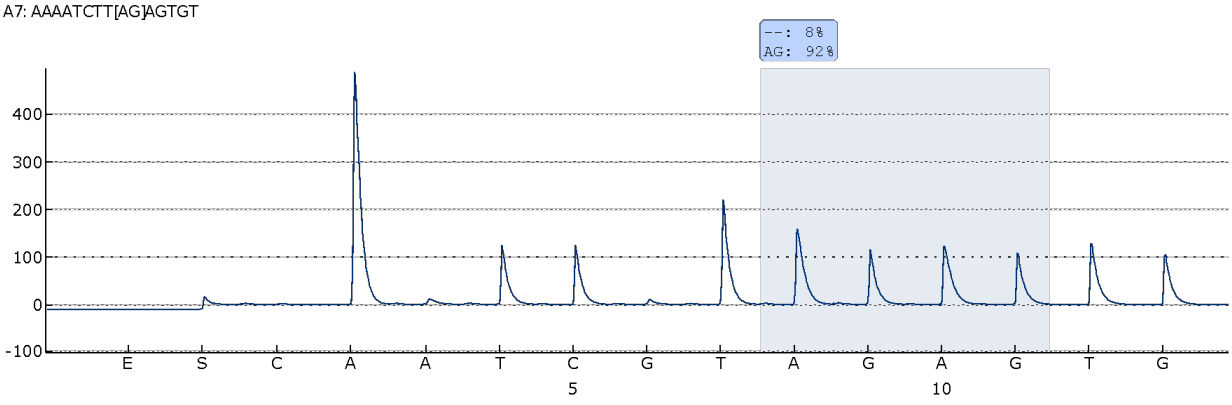
Полиморфизм: BRCA1 (185DelAG)

Гистограмма:



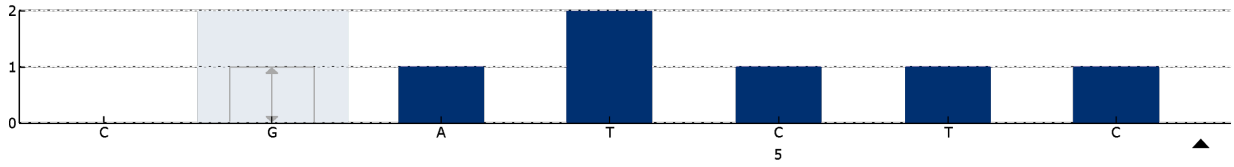
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: Ins/Ins



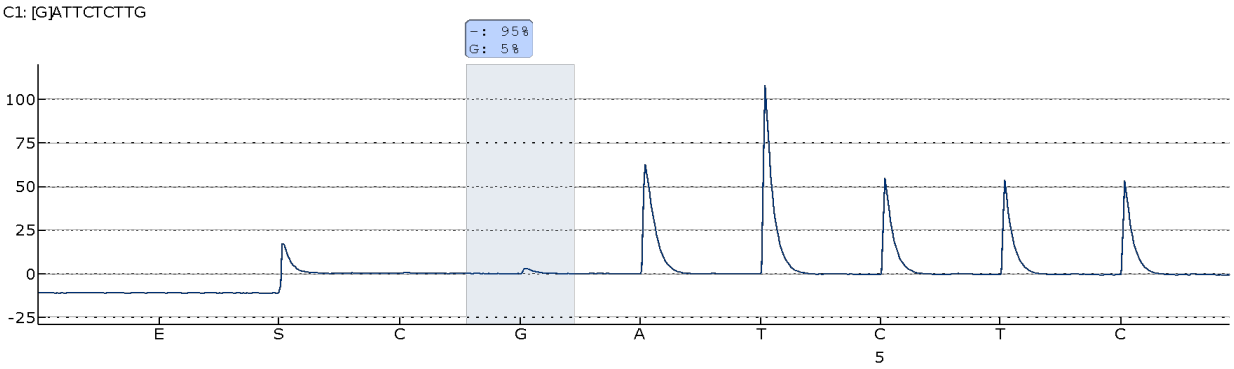
Полиморфизм: BRCA1 (5382InsC)

Гистограмма:



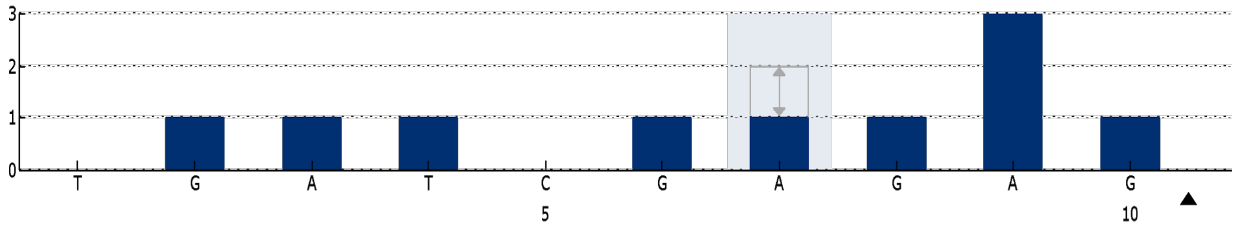
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: Del/Del



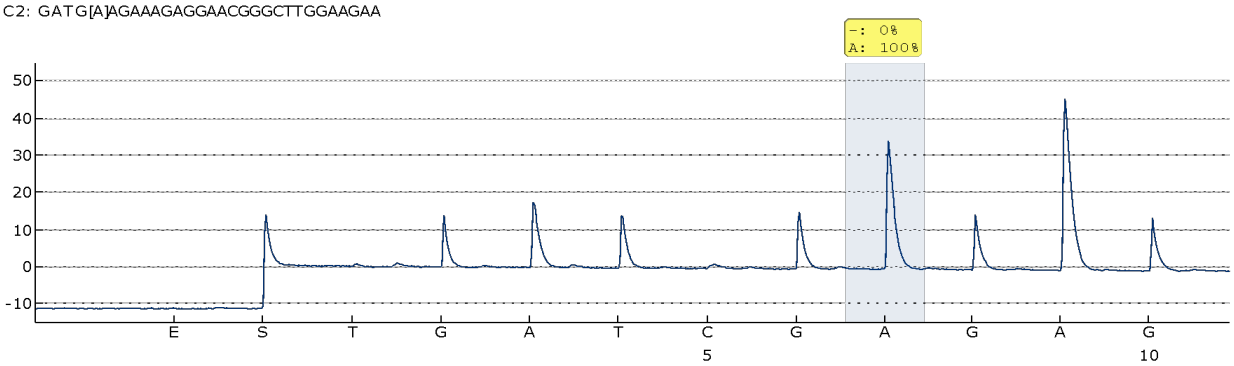
Полиморфизм: BRCA1 (4153DelA)

Гистограмма:



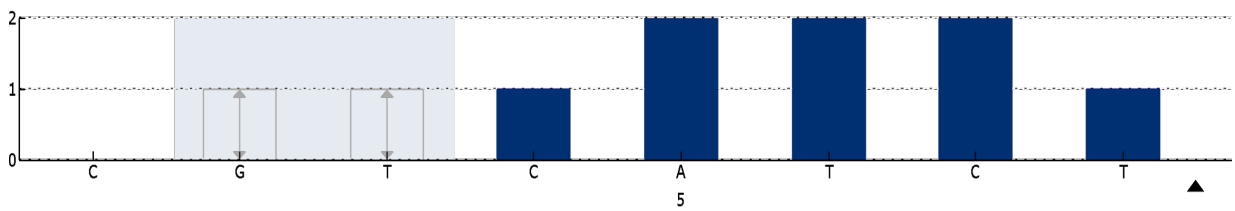
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: A/A

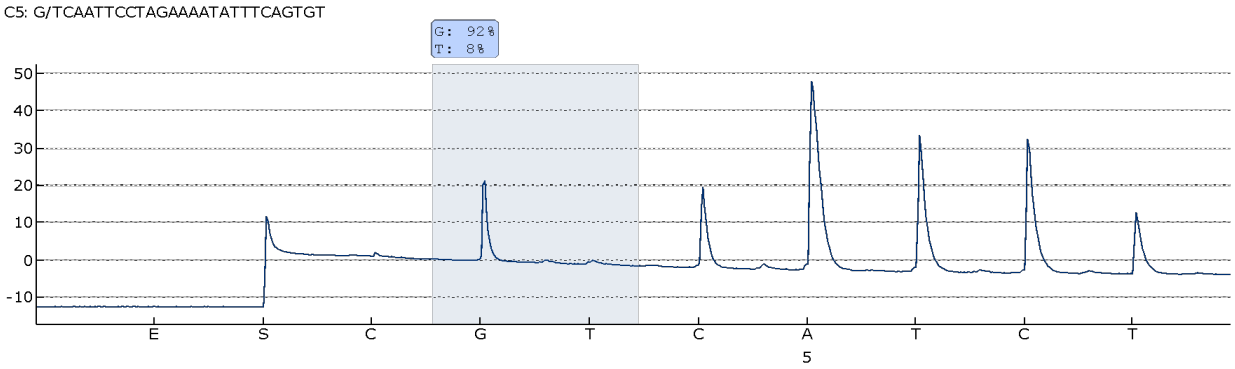


Полиморфизм: BRCA1 (A1708E/V)

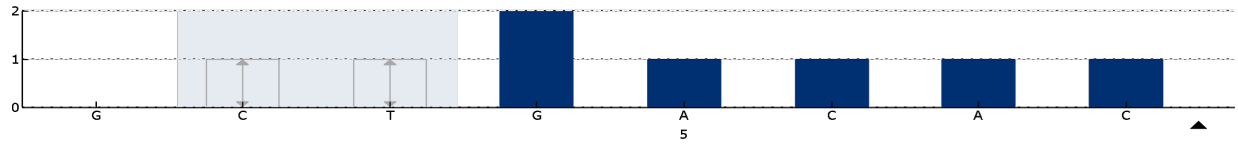
Гистограмма:



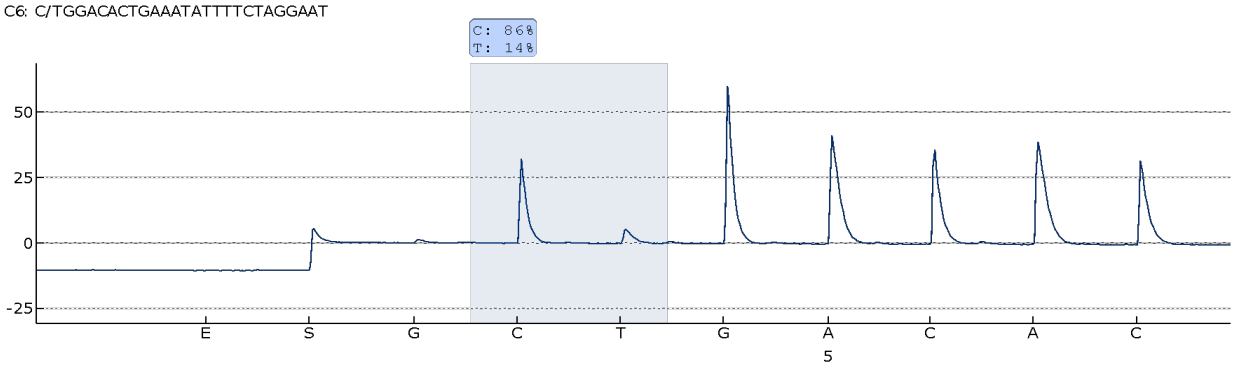
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Генотип: G/G



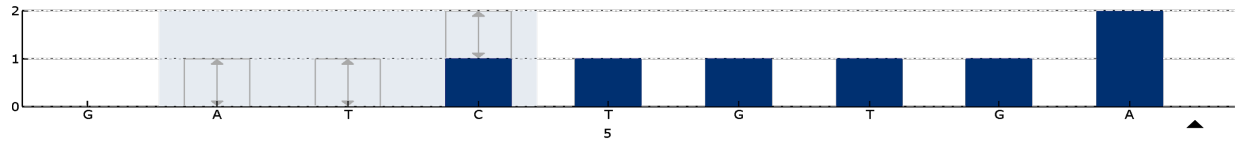
Полиморфизм: BRCA1 (Arg1699Trp)
Гистограмма:



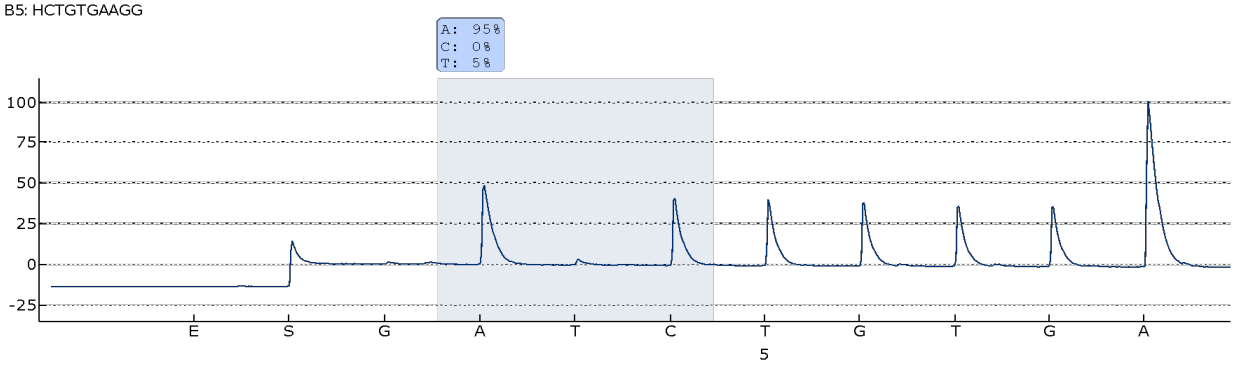
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Генотип: C/C



Полиморфизм: BRCA1 (C61G)
Гистограмма:

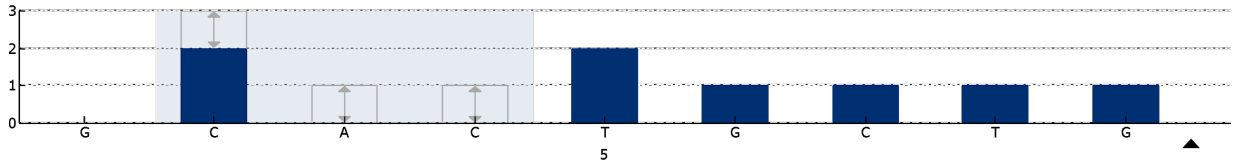


Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Генотип: A/A



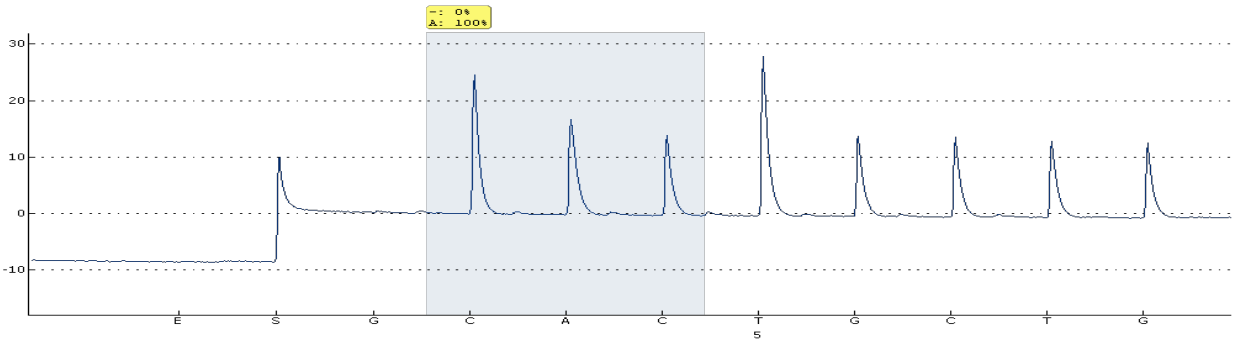
Полиморфизм: BRCA2 (6174DelT)

Гистограмма:



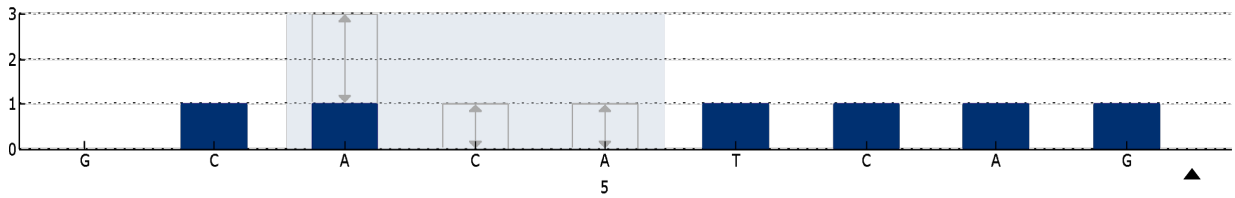
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: A/A



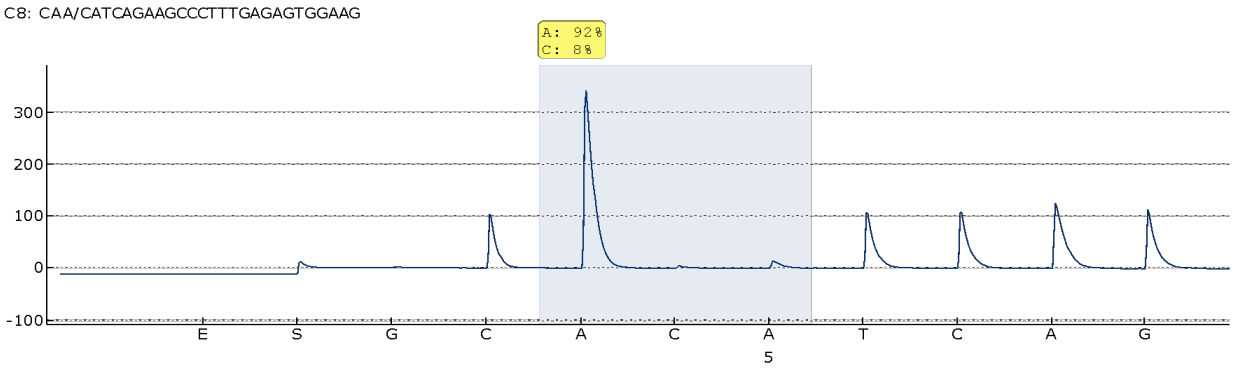
Полиморфизм: BRCA2 (Asn372His)

Гистограмма:

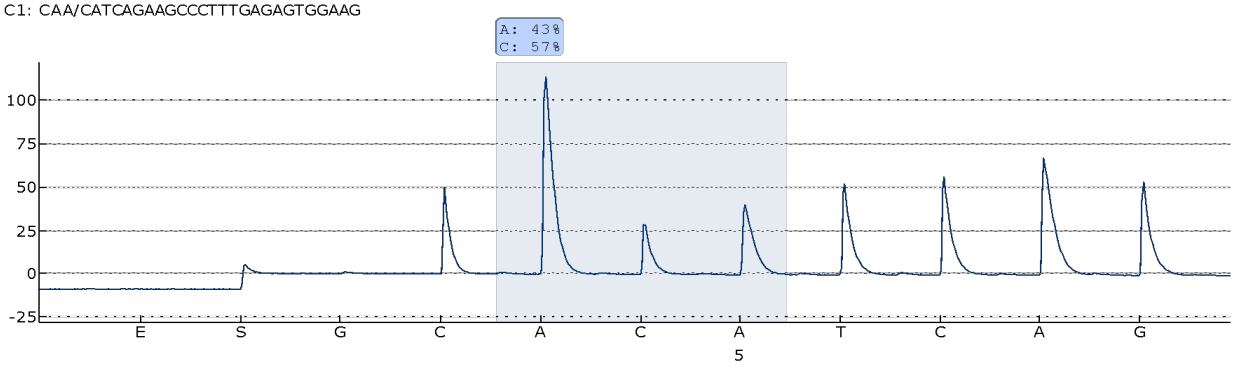


Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: A/A

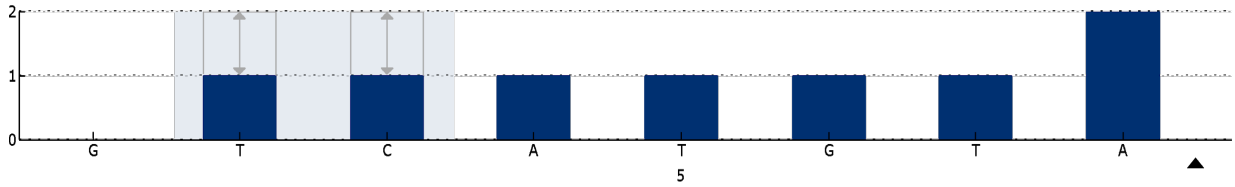


Генотип: A/C



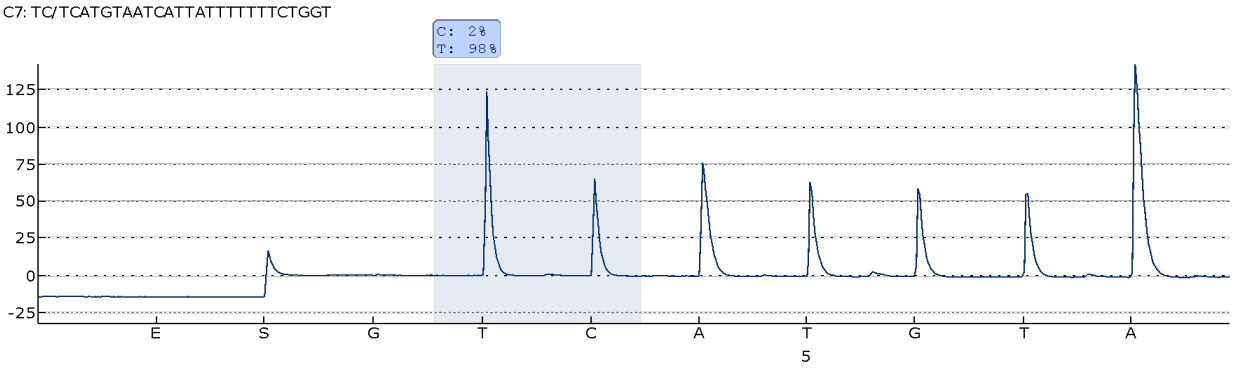
Полиморфизм: BRCA2 (Asn991Asp)

Гистограмма:



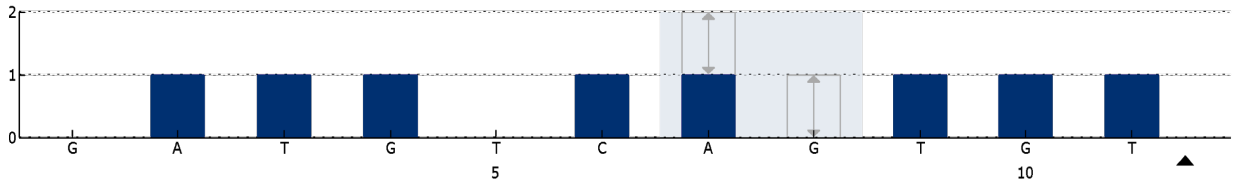
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: T/T



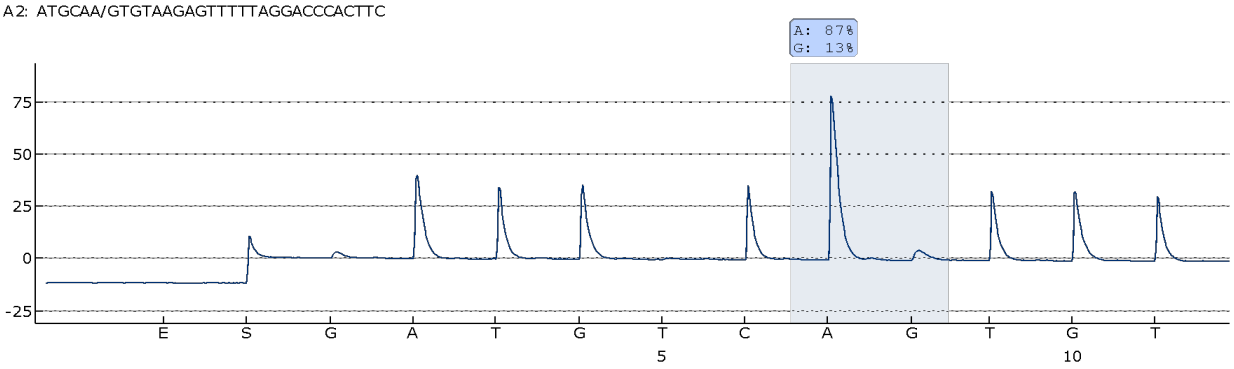
Полиморфизм: CHEK2 (Ile157Thr)

Гистограмма:



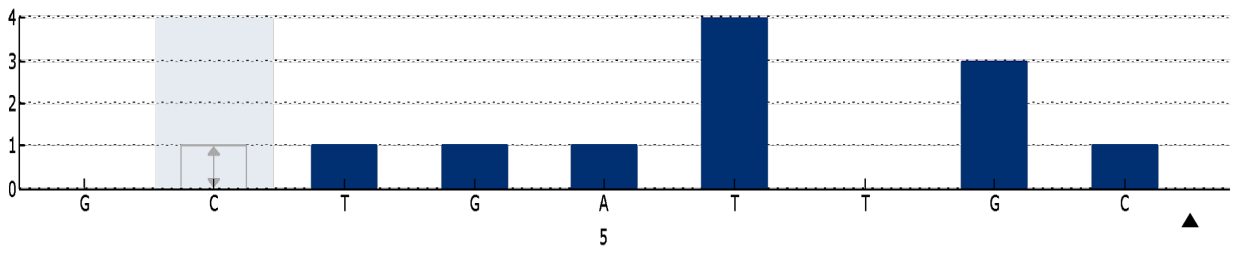
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: A/A

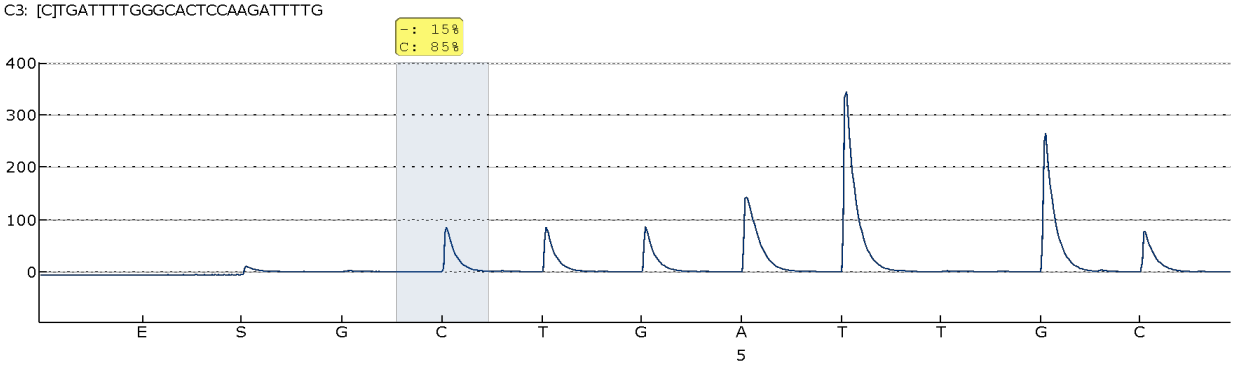


Полиморфизм: CHEK2 (1-bp Del)

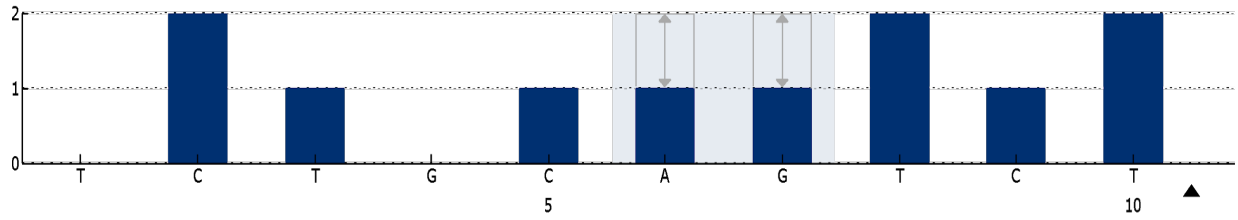
Гистограмма:



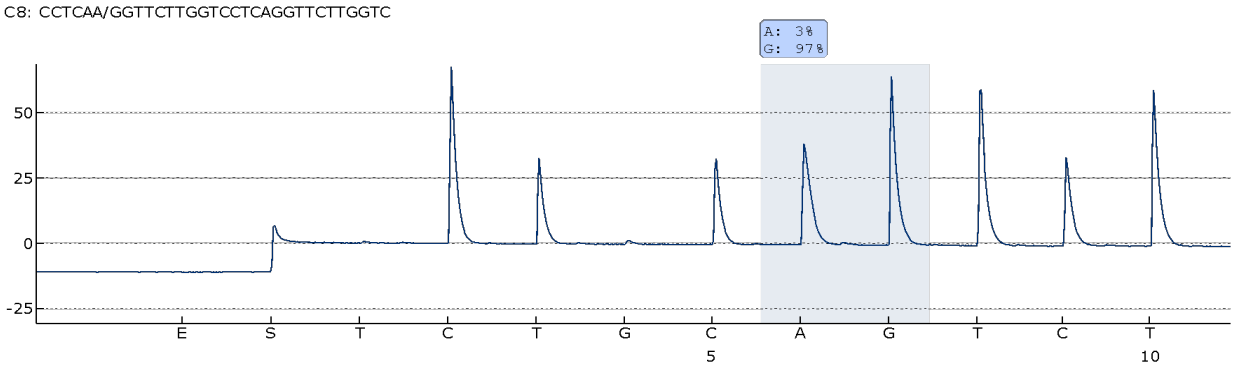
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Генотип: C/C



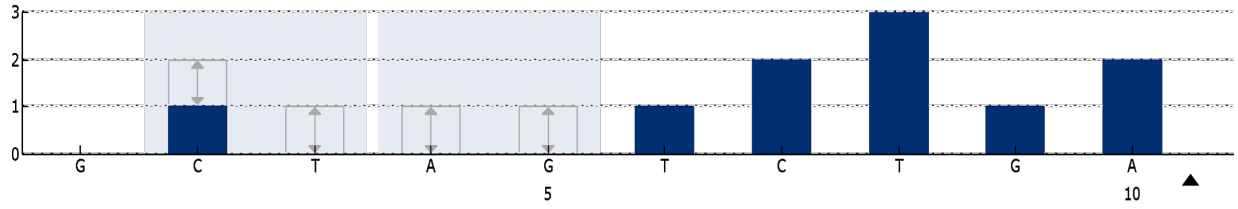
Полиморфизм: CHEK2 (Pro85Leu)
Гистограмма:



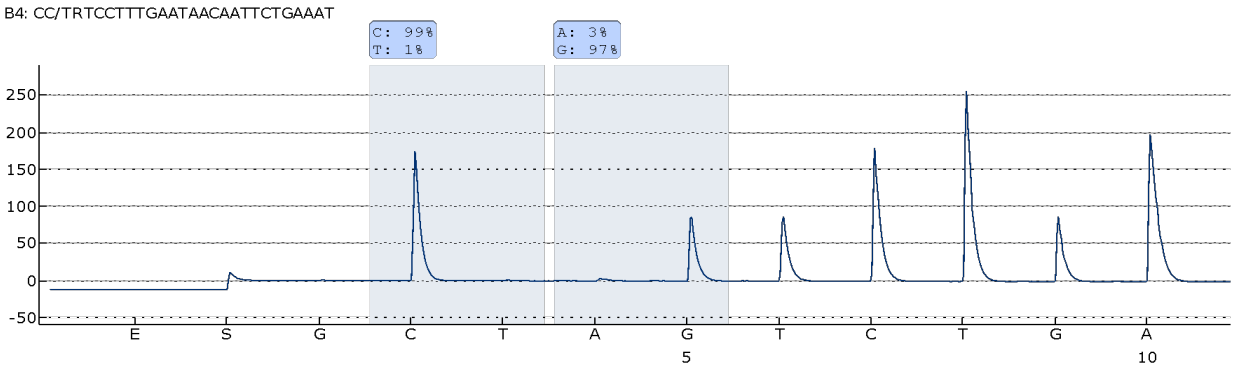
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Генотип: G/G



Полиморфизм: CHEK2 (Arg181His) и CHEK2 (Arg181Cys)
Гистограмма:

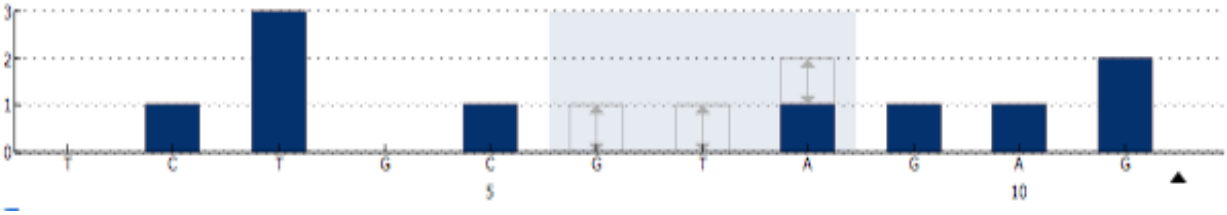


Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Полиморфизмы CHEK2 (Arg181His) и CHEK2 (Arg181Cys) расположены близко друг к другу, поэтому оба полиморфизма анализируются одновременно. Для анализа используется один и тот же ампликон, а реакция пиросеквенирования проходит с одного сиквенсного праймера.
Генотип:
Arg181His – C/C
Arg181Cys - G/G



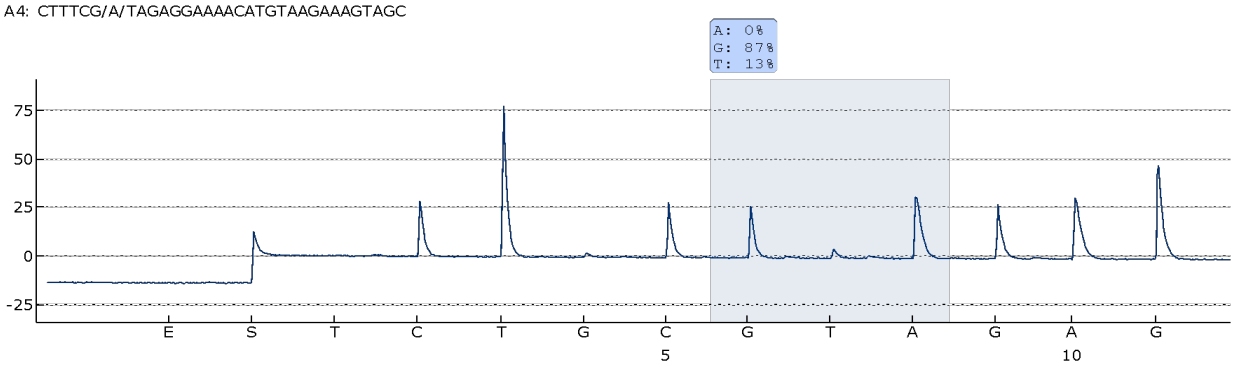
Полиморфизм: CHEK2 (Glu239Lys/Ter)

Гистограмма:



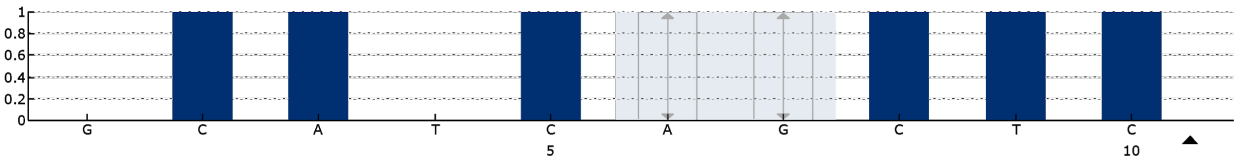
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: G/G



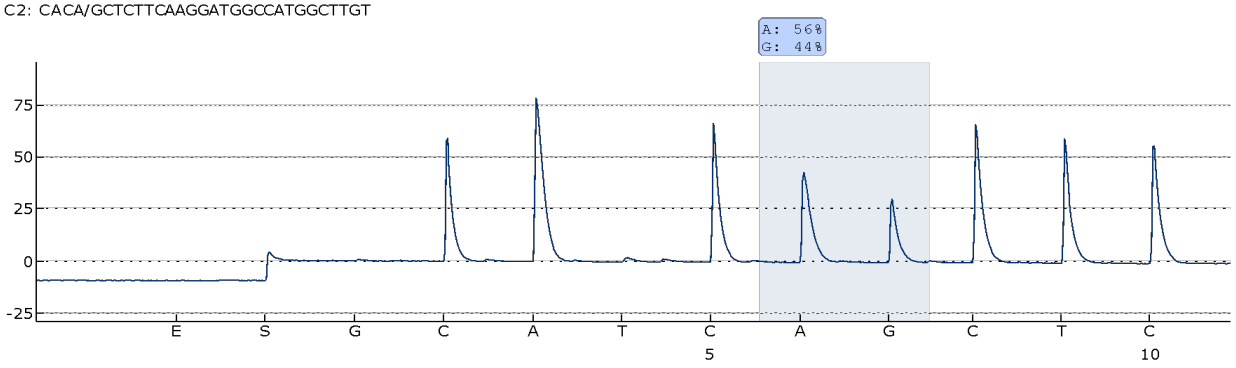
Полиморфизм: FGFR2 (rs1219648)

Гистограмма:

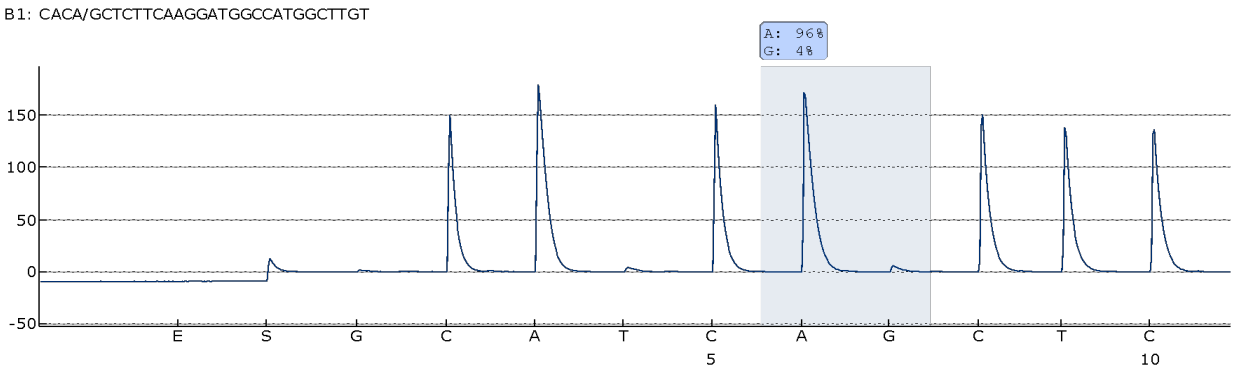


Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: A/G

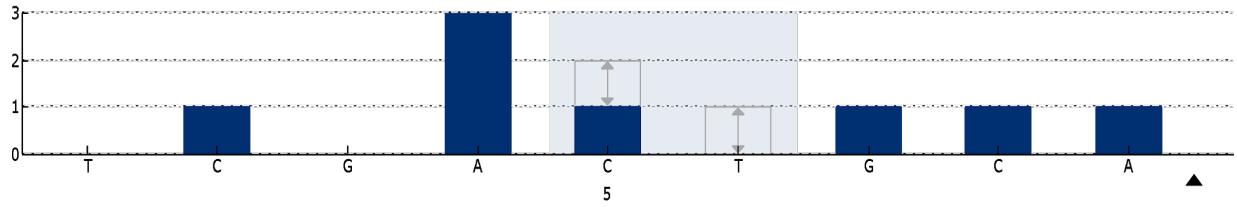


Генотип: A/A



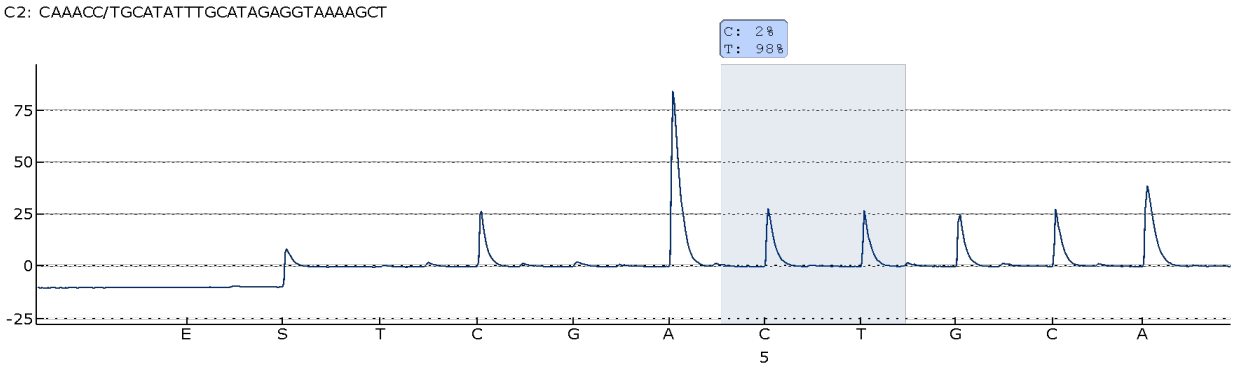
Полиморфизм: FGFR2 (rs2981578)

Гистограмма:



Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

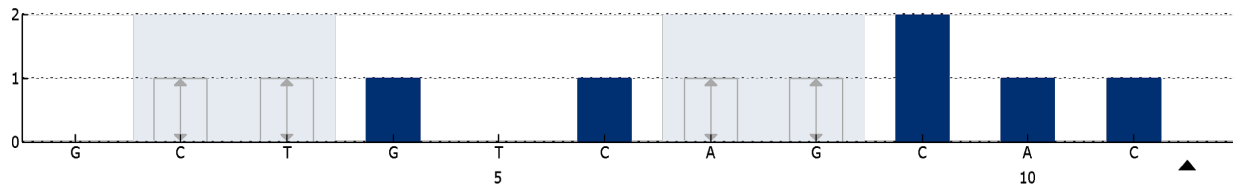
Генотип: T/T



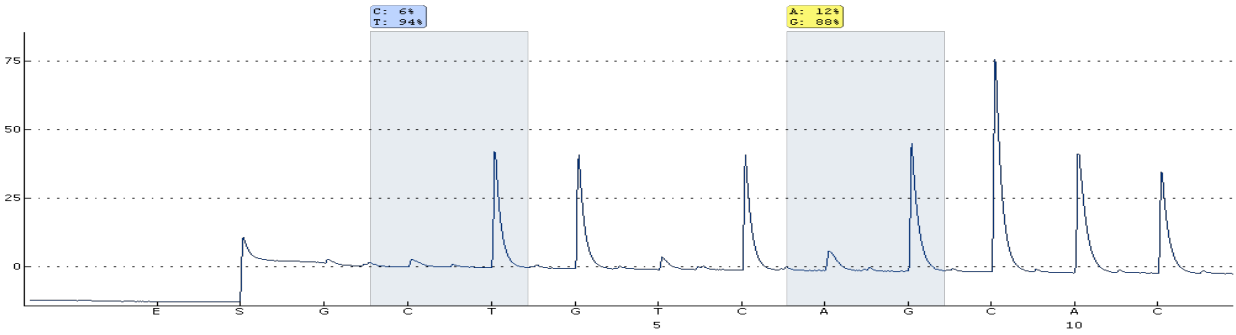
Полиморфизм: FGFR2 (rs7895676)

Гистограмма:

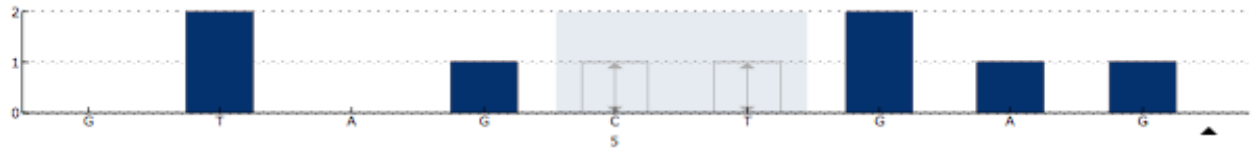
Следует учитывать, что рядом с анализируемым полиморфизмом присутствует полиморфизм rs2420945 - A/G, который не несет смысловой нагрузки, но его следует учитывать при пиросеквенировании.



Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Генотип: T/T

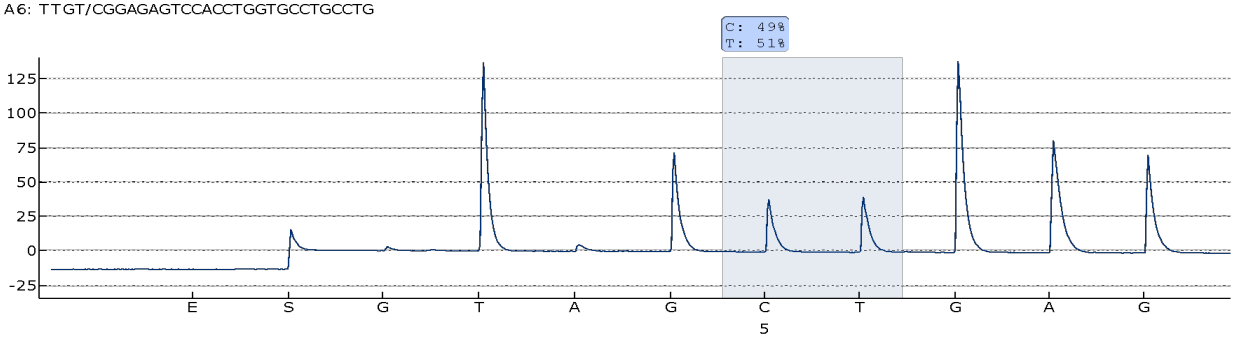


Полиморфизм: FGFR2 (rs2981582)
Гистограмма:

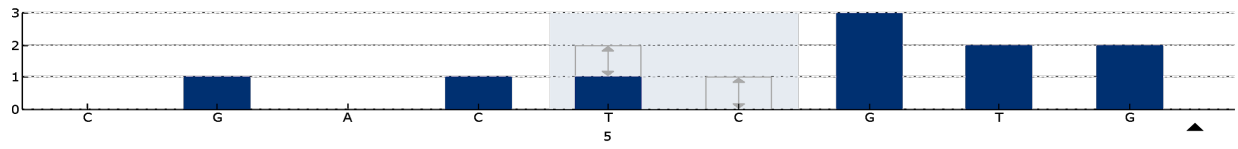


Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Генотип: C/T

A6: TTGT/CGGAGAGTCCACCTGGTGCCTGCCTG

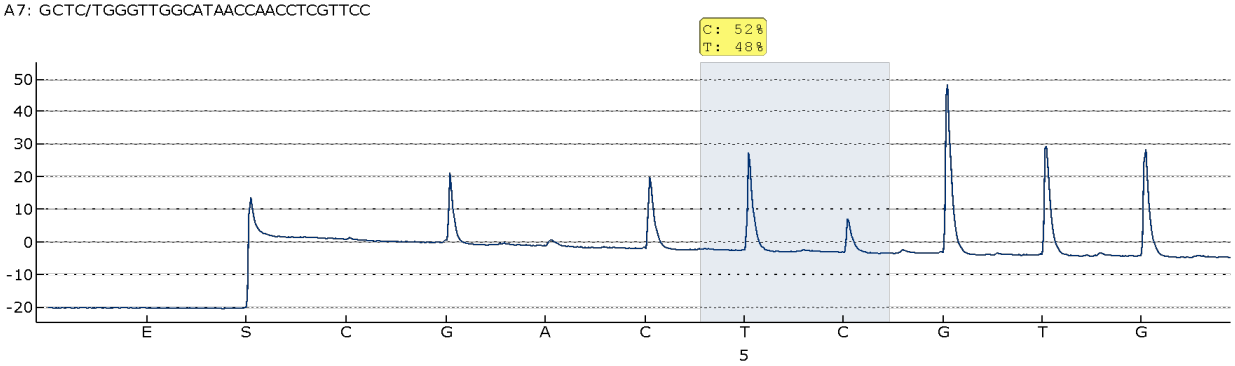


Полиморфизм: FGFR2 (rs3135718)
Гистограмма:



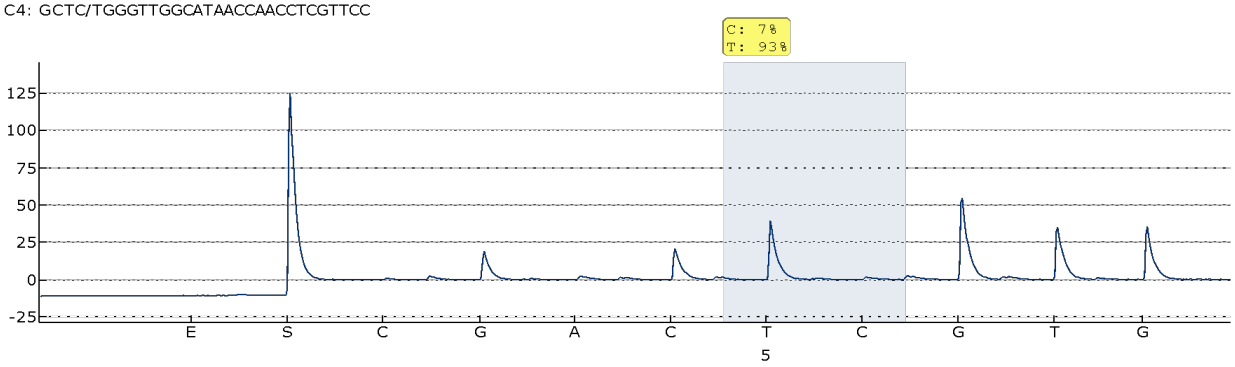
Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):
Генотип: C/T

A7: GCTC/TGGGTTGGCATAACCAACCTCGTTCC



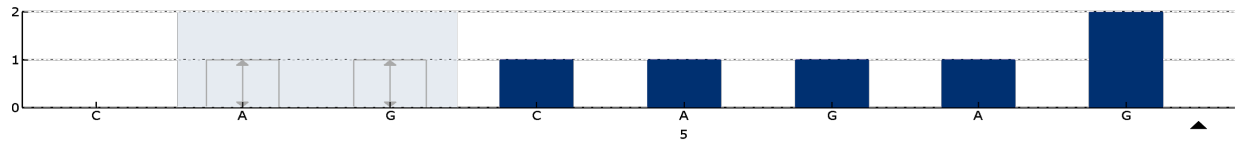
Генотип: T/T

C4: GCTC/TGGGTTGGCATAACCAACCTCGTTCC



Полиморфизм: FGFR2 (rs2981579)

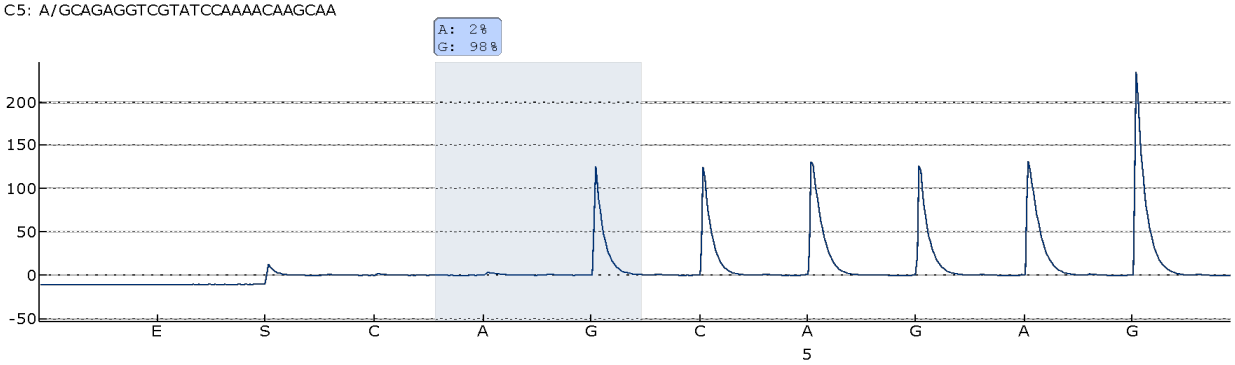
Гистограмма:



Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

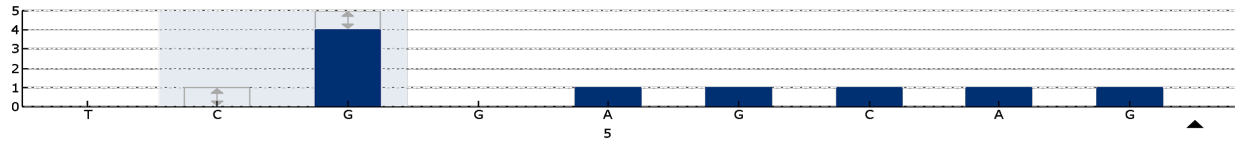
Генотип: G/G

C5: A/GCAGAGGTCGTATCCAAAACAAGCAA



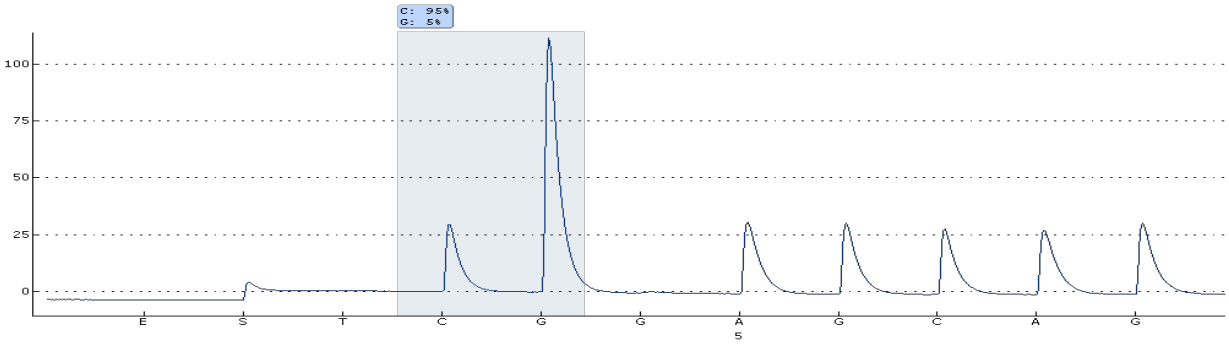
Полиморфизм: TP53 (Arg72Pro)

Гистограмма:



Пример результата пиросеквенирования (пирограмма):

Генотип: C/C



11. Условия транспортирования, хранения и использования набора реагентов

Транспортирование:
ПЦР-буфер, праймеры для амплификации и праймеры для секвенирования транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток. Taq-полимеразу транспортировать при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.
Хранение:
Праймеры, ПЦР-буфер и ОКО хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С, до истечения срока годности, указанного на упаковке. При частом использовании допустимо кратковременное хранение при 2 до 8 °С. Для длительного хранения лучше заморозить.
Taq-полимеразу хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С, до истечения срока годности, указанного на упаковке.
Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, использованию не подлежит.
Срок годности:
Срок годности - 12 мес. с даты изготовления. Дата изготовления указана на упаковке.
Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

12. Порядок подачи рекламаций

Вопросы, касающиеся качества наборов, отзывы и предложения следует направлять по адресу:
ООО «Аллель» 123458 г. Москва, ул. Твардовского д. 8,
Технопарк «Строгино».
тел: +7 495 780 92 96
эл.почта: info@allel.tech
www.alleltech.com