

Real-time-PCR-DPYD-G735A

Инструкция по применению

Набор реагентов для выявления мутации G735A в гене DPYD с использованием ПЦР в режиме реального времени

Номер каталога: 20801 Набор для 50 реакций

Только для исследовательского применения

Версия: январь 2020г

Хранить от -15 до -25°C



Введение	3
1. Назначение набора	3
2. Принцип действия набора.....	3
3. Материал для исследования	4
4. Состав набора.....	5
5. Необходимые реактивы и инструменты не входящие в набор	5
6. Транспортировка и хранение.....	5
7. Ограничения по использованию	6
8. Меры предосторожности	6
9. Перед началом работы	6
10. Проведение аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.....	7
10.1. Приготовление смеси для ПЦР.	7
10.2. Программирование амплификатора CFX96 (Bio-Rad)	8
11 Анализ результатов	10
12. Техническая поддержка	11

Введение

Один из наиболее популярных препаратов, используемых в химиотерапии онкологических заболеваний различных локализаций (желудочно-кишечного тракта, кожи, молочной железы и т.д.) это 5-фторурацил. Ген DPYD кодирует фермент Дигидропиримидиндегидрогеназу, который играет ключевую роль в катаболизме 5-фторурацила. До 90% препарата превращается в организме в неактивную форму посредством этого фермента и лишь 10% достигает мишени. Мутация DPYD G735A – наиболее часто встречающаяся мутация в гене DPYD человека. Эта мутация приводит к формированию белка DPYD с полным отсутствием ферментативной активности. Из-за сниженной интенсивности деградации 5-фторурацила у пациентов, имеющих данную мутацию, эффективная доза препарата оказывается выше ожидаемой в 5-10 раз и вызывает появление различных токсических реакций. Анализ мутаций в гене DPYD перед применением 5-фторурацила позволит, в случае обнаружения мутации, снизить дозу препарата и уменьшить его токсический эффект или подобрать другой препарат.

1. Назначение набора

Набор предназначен для выявления точечной мутации GGT→GCT в 735 кодоне гена DPYD, коррелирующей с токсичностью для организма 5-фторурацила. Анализ проводится методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. Сбор данных происходит в ходе выполнения ПЦР непосредственно в закрытой пробирке, что минимизирует риск контаминации и существенно упрощает процесс анализа.

Набор оптимизирован для использования с амплификатором для ПЦР в режиме реального времени “CFX96” (Bio-Rad, США). Использование других приборов может потребовать изменения параметров ПЦР и повлиять на чувствительность метода.

Набор предназначен только для исследовательского применения.

2. Принцип действия набора

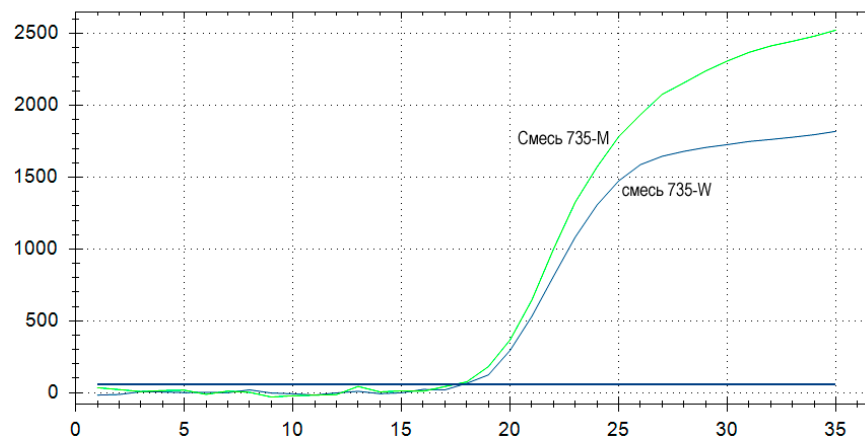
Набор содержит смесь для ПЦР и 2 смеси праймеров: 1 смесь для мутации (735-M) и 1 контрольная смесь (735-W). Продукты ПЦР гена DPYD идентифицируются в 5'-нуклеазной реакции с помощью зонда меченного FAM. ПЦР смесь содержит Taq ДНК полимеразу. Набор также включает положительный контроль (ПКО) - ДНК с мутацией в гене DPYD и отрицательный контроль (ОКО) - ДНК человека без мутации.

Для выполнения анализа необходимо провести 2 реакции с исследуемым образцом ДНК: с использованием смеси праймеров «735-W» (для детекции ДНК гена DPYD дикого типа) и с использованием смеси праймеров «735-M» (для детекции ДНК гена DPYD с мутацией G735A). В каждый эксперимент рекомендуется включать ПЦР с ПКО, ОКО и контролем без матрицы.

• **Образец является положительным (содержащим мутацию)**, если при использовании смесей праймеров 735-M и 735-W появляются кривые амплификации, пересекающие порог флуоресценции с разницей не более чем в 1 цикл (в идеальном случае одна кривая должна накладываться на другую). (Рис.1Б)

- **Образец является отрицательным (без мутации)**, если при использовании смеси праймеров 735-W появляется кривая амплификации, которая пересекает порог флуоресценции не позднее 35 цикла и отсутствует кривая амплификации при использовании смеси праймеров 735-M или пересекает порог флуоресценции не ранее чем через 8 циклов после кривой W. (Рис.1А)

Б



А

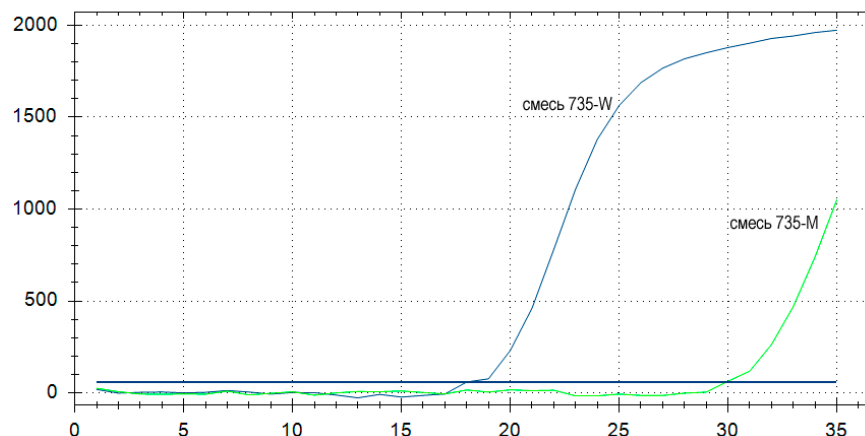


Рисунок 1. Пример кривых флуоресценции в аллель-специфичной ПЦР с праймерами дикого типа (W - синие линии) и праймерами для мутации (M - зеленые линии) А – 10 нг ДНК не содержащей мутацию DPYD G735A, Б – 10 нг ДНК с мутацией DPYD G735A.

3. Материал для исследования

В качестве материала для анализа используется ДНК выделенная из крови человека. Кровь не замораживать! Хранить до момента выделения ДНК при +4°C не более 48 часов.

Важно: Не использовать гепаринизированную кровь!

Для ПЦР достаточно 10-100 нг геномной ДНК. Минимальное количество ДНК, необходимое для анализа, – 2 нг. Максимальное количество ДНК, которое может быть использовано для 1 анализа, – 1000 нг.

Набор не содержит реактивов для выделения ДНК.

4. Состав набора

Набор содержит реактивы достаточные для проведения 50 реакций с образцами ДНК и контролями. Набор состоит из пробирок с реагентами с цветными крышками (Таблица 1) и инструкции по применению.

Таблица 1. Состав набора.

№ пробирки	Цвет крышки	Содержимое	Набор x 50 Кат.№20801
1	Зеленый	Смесь праймеров 735-W*	120 мкл
2	Фиолетовый	Смесь праймеров 735-M**	120 мкл
3	Желтый	ПЦР смесь с Taq ДНК-полимеразой	960 мкл
4	Бесцветный	ДНК без мутации***	80 мкл
5	Красный	ДНК DPYD G735A****	80 мкл
6	Белый	Вода для ПЦР	1,7 мл

* Праймеры для выявления гена DPYD без мутации G735A

** Праймеры для выявления гена DPYD с мутацией G735A

*** Фрагмент геномной ДНК человека не содержащей мутации DPYD G735A- ОКО;

**** Фрагмент геномной ДНК человека с мутацией G735A в гене DPYD - ПКО;

5. Необходимые реактивы и инструменты, не входящие в набор

- Одноразовые перчатки;
- Прибор для ПЦР в режиме реального времени с блоком на 96 лунок, например, CFX96 (Bio-Rad);
- 8-луночные стрипы с плоскими крышками или 96-луночные планшеты для ПЦР в режиме реального времени;
- Пипетки-дозаторы переменного объема на 0.5-10, 2-20, 10-100, 200-1000мкл типа Ленпипет (Россия) и одноразовые наконечники с фильтрами для ПЦР;
- Стерильные микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл;
- Микроцентрифуга на 10.000 об/мин;
- Вортекс;
- Холодильник +2-+8°C с морозильной камерой -18...- 24°C;
- Твердотельный минитермостат с терморегулятором на 37-95°C;
- Реактивы для выделения ДНК из крови, например, Blood DNA Kit (Кат. №31601, Биолинк, Россия).

6. Транспортировка и хранение

Набор поставляется с охлаждающими блоками. Немедленно по получении поместить набор в морозильную камеру и хранить при температуре не выше -18°C.

Время нахождения набора на свету должно быть минимальным.

Избегать размораживания/замораживания более 4-5 раз.

При правильном использовании срок хранения – 12 месяцев.

Внимание! Если реагенты прибыли не замороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел Техническая поддержка, стр. 12).

7. Ограничения по использованию

- Набор предназначен только для исследовательского применения;
- Для получения корректных результатов необходимо строго следовать настоящей инструкции;
- Не использовать компоненты наборов разных партий;
- Не использовать по истечении срока хранения.

8. Меры предосторожности

- Все компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны;
- Во избежание риска контаминации ПЦР необходимо следовать основным правилам работы в ПЦР лаборатории:
 - Пользоваться отдельными помещениями (ПЦР-боксами) для выделения образцов ДНК и постановки ПЦР;
 - Использовать лабораторную одежду и одноразовые перчатки;
 - В каждом помещении (ПЦР-боксе) пользоваться отдельным комплектом автоматических пипеток-дозаторов;
 - Всегда использовать только одноразовый пластик (наконечники с фильтрами, пробирки и.т.п.);
 - Хранить ДНК-контроли и образцы ДНК в специальном холодильнике отдельно от других компонентов набора;
- Использованные реагенты утилизировать как клинические отходы.

9. Перед началом работы

- Помимо образцов в каждый эксперимент должен быть включен контроль без матрицы (вода для ПЦР);
- ПЦР смесь, смеси праймеров и ДНК контроли следует размораживать при комнатной температуре, проверяя, чтобы раствор полностью растаял. Перед открытием пробирки необходимо перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне;
- После приготовления смесей для ПЦР важно сразу убирать оставшиеся реагенты на -20°C.

10. Проведение аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени

10.1. Приготовление смеси для ПЦР.

10.1.1. Рассчитать необходимое количество ПЦР смеси, праймеров и воды для тестирования клинических образцов, ПКО, ОКО и контроля воды без матрицы с учетом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в Таблице 2, для тестирования N образцов это количество необходимо умножать на **(N + 4)**.

Таблица 2. Количество реагентов на 1 реакцию:

Реагент	Количество, мкл
ПЦР смесь (с Taq полимеразой)	8
Смесь праймеров 735-W или 735-M	2
Вода	12

Пример расчета необходимого количества реагентов для тестирования 5 образцов ДНК:

ПЦР смесь (с Taq ДНК полимеразой) = 8 мкл × (5+4) = 72 мкл,

Смесь праймеров 735-W (или 735-M) = 2 мкл × (5+4) = 18 мкл

Вода = 12 × (5+4) = 108 мкл

Примечание! Если концентрация образца ДНК слишком мала для получения корректного результата, то в реакционную смесь нужно внести больший объем исследуемого образца, уменьшив при этом объем воды (например, 6 мкл ДНК и 9 мкл воды)

10.1.2. Приготовить и промаркировать две 1,5 мл пробирки: «М» (для реакционной смеси, содержащей праймеры на мутацию DPYD G735A) и «W» (для реакционной смеси, содержащей праймеры на дикий тип DPYD без мутации).

10.1.3. Быстро разморозить при комнатной температуре или при 37°C ПЦР смесь (пробирка №3, желтая крышка) и смеси праймеров (пробирки № 1 и 2, зеленая и фиолетовая крышки) до полного растворения. Перемешать на вортексе или переворачивая пробирку 4-5 раз, центрифугировать закрытые пробирки на мини-центрифуге в течение 5 сек, чтобы собрать капли на дно.

Использовать немедленно, время нахождения смесей при комнатной температуре должно быть минимальным.

10.1.4. Приготовить две общие реакционные смеси в пробирках на 1.5 мл согласно расчету (пункт 10.1.1): внести в каждую пробирку расчетное количество ПЦР смеси, воду и добавить смесь праймеров «735-W» (или «735-M») в соответствующие промаркированные пробирки, тщательно перемешать, используя вортекс. Реакционные смеси готовы.

Неиспользованные остатки исходной ПЦР смеси и праймеров немедленно поместить на -20°C!

10.1.5. Подготовить и промаркировать на стенке 96-луночную планшету или 8-луночные стрипы для ПЦР.

Важно! ВО ИЗБЕЖАНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОПТИКИ АМПЛИФИКАТОРА НЕ МАРКИРОВАТЬ НА КРЫШКАХ

Добавить в лунки по 22 мкл готовых реакционных смесей «W» и «М». При тестировании 5ти образцов можно располагать реакции по схеме на Рис.2. При этом «W» ПЦР смесь вносится в лунки ряда D, «М» ПЦР смесь - в лунки ряда E.

			ДНК №1	ДНК №2	ДНК №3	ДНК №4	ДНК №5	C+	C-	H ₂ O		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D			Unk FAM DNA #1	Unk FAM DNA #2	Unk FAM DNA #3	Unk FAM DNA #4	Unk FAM DNA #5	Pos FAM	Neg FAM	NTC FAM		
E			Unk FAM DNA #1	Unk FAM DNA #2	Unk FAM DNA #3	Unk FAM DNA #4	Unk FAM DNA #5	Pos FAM	Neg FAM	NTC FAM		
F												
G												
H												

«W» ПЦР смесь
«М» ПЦР смесь

Рисунок. 2 Схема размещения образцов в блоке амплификатора при тестировании 5 препаратов ДНК. Идентичная ПЦР смесь вносится в лунки одного горизонтального ряда, а идентичные образцы - в лунки одного столбца. «H₂O» – контроль без матрицы (реакция без ДНК, NTC), «C+» – ПКО (ДНК с мутацией DPYD G735A) «C-» – ОКО (ДНК без мутации DPYD G735A).

10.1.6. Разморозить и перемешать в течение 3-5 сек на вортексе положительный и отрицательный ДНК контроли (пробирки №4 и 5, бесцветная и красная крышки). Центрифугировать в течение 5-10 сек, чтобы собрать капли на дно.

10.1.7. Добавить соответствующую ДНК в каждую лунку согласно схеме (Рис. 2):

3 мкл воды в лунки для контроля без матрицы (столбец 10),

3 мкл ОКО в лунки для отрицательного контроля (столбец 9),

3 мкл ПКО в лунки для положительного контроля (столбец 8),

3 мкл ДНК клинических образцов в соответствующие лунки (столбцы 3-7).

10.1.8. Закрывать крышки, легко перемешать постукивая по стенке. Центрифугировать в течение 2 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать жидкость на дне пробирок.

10.1.9. Установить стрипы/планшет в блок амплификатора. Для прогрева прибора включить его за 10 минут до начала использования.

10.2. Программирование амплификатора CFX96 (Bio-Rad)

10.2.1. Создание протокола

10.2.1.1. В окне **Experiment Setup** во вкладке **Protocol** выбрать **Create New** для

создания нового протокола. Откроется окно **Protocol Editor** (Рис. 3).

10.2.1.2. В окне **Protocol Editor** задать этапы реакции в соответствии с Таблицей 3. Задать объем образца 25 мкл в поле **Sample volume**.

10.2.1.3. Нажать **Ok**. Задать название протокола в диалоговом окне **Save As**, затем нажать **Save**.

Для детального описания как задать параметры для ПЦР в реальном времени см. инструкцию к программному обеспечению амплификатора.

Таблица 3. Протокол ПЦР в реальном времени для набора DPYD G735A.

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	1 Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	1 Денатурация	95°C	10 сек	Нет
	2 Отжиг праймеров	62°C	5 сек	
	3 Удлинение цепи	72°C	40 сек	
35	1 Денатурация	95°C	10 сек	Да
	3 Оптическое измерение	62°C	55 сек	

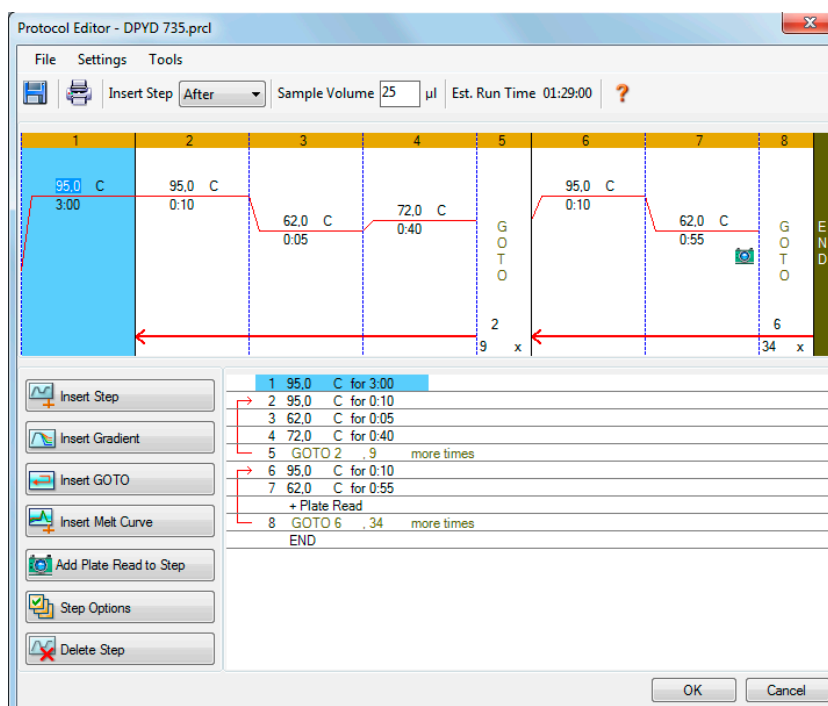


Рисунок 3. Создание протокола в окне Protocol Editor.

10.2.2. Задание планшеты

10.2.2.1. В окне **Experiment Setup** во вкладке **Plate** выбрать **Create New**. Откроется окно **Plate Editor** (Рис. 4).

10.2.2.2. Нажать кнопку **Select Fluorophores** (Рис. 4, 1) и выбрать флуорофор **FAM**.

10.2.2.3. Выделить ячейки и выбрать тип образца в выпадающем меню **Sample type** (**Unknown** для анализируемых образцов, **Positive control** для ПКО, **Negative control** для О и **NTC** для контроля без матрицы (воды) (Fig. 4, 2) и поставить галочку напротив флуорофора **FAM** (Рис. 4, 3).

10.2.2.4. При необходимости задать Наименование образца в поле **Sample Name** и номер повтора в поле **Replicate number** при постановке в дублях

10.2.2.5. Сохранить заданную планшету, нажав **Ok**. Задать новое название файла или сохранить поверх предыдущей версии.

Для детального описания как задать параметры для ПЦР в реальном времени см. инструкцию к программному обеспечению амплификатора.

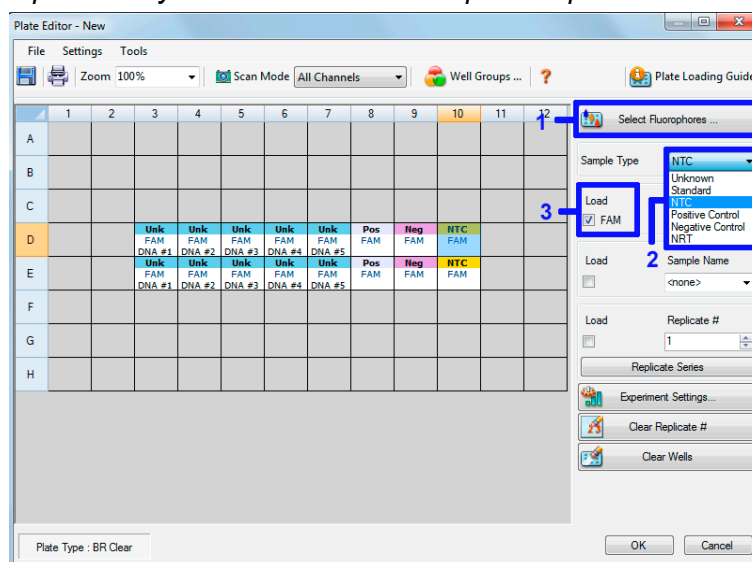


Рисунок 4. Задание планшеты в окне Plate Editor.

10.2.3. Запуск протокола

10.2.3.1. Во вкладке **Start Run** окна **Experiment Setup** нажать кнопку **Open Lid**. Установить стрипы/планшет в блок амплификатора в соответствии с заданными параметрами и нажать кнопку **Close Lid** чтобы закрыть крышку.

10.2.3.2. Проверить, что заданы правильные **Protocol** и **Plate**;

- Нажать кнопку **Start Run**;
- Задать название файла в диалоговом окне **Save Optical Data File**.
- Нажать **OK**.

Когда ПЦР будет запущен, откроется окно **Run Details**, во вкладке **Real-Time Status** можно следить за ходом ПЦР в режиме реального времени.

10.2.3.4. По окончании ПЦР автоматически откроется окно **Data Analysis** с результатами.

11 Анализ результатов

Результаты ПЦР учитываются путем сравнения графиков кривых флуоресценции для каждого образца ДНК между реакционными смесями «M» и «W» (см. Рис.1).

В качестве ориентира используют графики кривых флуоресценции для ПКО (содержащего мутацию DPYD G735A) и ОКО (не содержащего мутацию).

11.1. Открыть окно **Data Analysis**. Программа автоматически выставит уровень фона для каждой лунки и рассчитывает значение Ct.

11.2. Открыть вкладку **Quantitation Data**, чтобы увидеть таблицу со значениями Ct.

11.3. Проверить значение Ct контроля без матрицы (реакция без ДНК, "H₂O"): допустимо значение Ct ≥ 32. Если значение Ct_{H₂O} < 32, то это является признаком неспецифической реакции (контаминация реакционной смеси, праймер-димеры) и требует повторения анализа.

Если при повторном анализе значение Ct_{H₂O} остается < 32, то ПЦР смесь необходимо заменить на новую.

11.4. Для лунок, содержащих смесь праймеров «735-W» проверить Ct ПКО и ОКО.

Допустимо значение $15 \leq Ct \leq 25$. Если значение Ct > 25, то это признак неэффективной реакции и требует повторения анализа.

11.5. Для лунок, содержащих смесь праймеров «735-M» проверить Ct ПКО и ОКО.

Для ПКО (с мутацией) допустимо значение $15 \leq Ct \leq 25$. Если значение Ct > 25, то это признак неэффективной ПЦР и необходимо повторить реакцию.

Для ОКО (без мутации) допустимо значение Ct ≥ Ct с праймерами «735-W» + 8. Если значение Ct < Ct с праймерами «735-W» + 8, то это признак неспецифической реакции (контаминация реакционной смеси, праймер-димеры) и требует повторения анализа.

11.6. Для каждого клинического образца сравнить кривые амплификации для лунок со смесью праймеров «735-W» и «735-M».

Образец является положительным (содержащим мутацию), если при использовании смесей праймеров 735-M и 735-W появляются кривые амплификации, пересекающие порог флуоресценции с разницей не более чем в 1 цикл (в идеальном случае одна кривая должна накладываться на другую).

Образец является отрицательным (без мутации), если при использовании смеси праймеров 735-W появляется кривая амплификации, которая пересекает порог флуоресценции не позднее 25 цикла и отсутствует кривая амплификации при использовании смеси праймеров 735-M или пересекает порог флуоресценции не ранее чем через 8 циклов после кривой W.

Внимание! При внесении в реакционную смесь с использованием праймеров 735-M большого количества (более 400 - 500 нг) исследуемой ДНК возможно появление неспецифической кривой флуоресценции, но не ранее, чем через 8 циклов после появления кривой специфической ПЦР для данного образца.

12. Техническая поддержка

С техническими вопросами обращаться в ООО «БиоЛинк»: 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40. E-mail: info@biolinklab.ru