

**Набор реагентов
для полногеномной амплификации ДНК**

"WGA Display"

Инструкция по применению

RUO

Только для исследовательских целей

Содержание

Содержание	2
Введение	3
Варианты исполнения.....	3
1 Назначение набора.....	3
2 Характеристика набора.....	4
2.1 Состав набора реагентов	4
2.2 Количество проводимых полногеномных амплификаций	4
2.3 Принцип действия набора	4
2.4 Ограничения при применении	5
3 Меры предосторожности.....	5
4 Оборудование и материалы.....	7
4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	7
4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов.....	7
5 Материал для проведения полногеномной амплификации	8
6 Подготовка к работе	8
7 Проведение полногеномной амплификации	10
7.1 Приготовление амплификационной смеси.....	10
7.2 Проведение амплификации	11
7.3 Проведение реамплификации	11
8 Оценка результатов полногеномной амплификации	12
9 Возможные проблемы и способы их устранения.....	13
10 Требования к транспортированию и хранению	14
10.1 Транспортирование.....	14
10.2 Хранение	14
11 Указания по применению.....	14
12 Требования к утилизации	15
13 Гарантийные обязательства.....	15
14 Маркировка	16

Введение

Полногеномная амплификация ДНК из единичных клеток широко используется в методиках преимплантационной генетической диагностики (ПГД) эмбрионов с дальнейшим анализом методами массового параллельного секвенирования (NGS), сравнительной геномной гибридизации (CGH) на чипах, высокочувствительных ПЦР-исследований и т.п.

Для проведения анализов перечисленными методами требуются минимальные количества геномной ДНК в диапазоне от 2 до 1000 нг. Однако одна человеческая клетка содержит около 7 пг ДНК, поэтому возникает необходимость применения полногеномной амплификации.

Варианты исполнения

Набор реагентов для полногеномной амплификации ДНК "WGA Display" (далее по тексту – набор реагентов) представлен в трех вариантах исполнения:

- 1). Набор реагентов на 12 реакций "WGA Display (12)";
- 2). Набор реагентов на 24 реакции "WGA Display (24)";
- 3). Набор реагентов на 96 реакций "WGA Display (96)".

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для амплификации малых количеств геномной ДНК человека (в общем случае, млекопитающих) с получением 1 – 2 мкг продукта в течение 3,5 – 4 часов.

Продукт амплификации, полученный с помощью набора реагентов, может быть использован для следующих видов анализа:

- анализ ДНК, выделенной из единичных клеток (Single cell DNA analysis);
- анализ вариации числа копий (Copy Number Variation (CNV) analysis);
- анализ методом массового параллельного секвенирования (Next Generation Sequencing (NGS) analysis);
- анализ однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping);
- анализ коротких tandemных повторов (Short Tandem Repeat (STR) analysis) и полиморфизма длин рестриционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis);
- анализ методом сравнительной геномной гибридизации (Comparative Genomic Hybridization (CGH)).

Набор реагентов предназначен только для исследовательских целей (RUO).

2 Характеристика набора





2.1 Состав набора реагентов

В состав набора входят следующие реагенты:

- 2,5x MM (мастер-микс без фермента),
- SD ДНК-полимераза,
- Контрольная ДНК, 50 нг/мкл (геномная ДНК человека),
- Вода для ПЦР.

Состав набора и объем реагентов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора и объем реагентов

Наименование реагента	Пробирка, шт	Цвет крышки пробирки	Номинальный объем, мкл		
			на 12 реакций	на 24 реакции	на 96 реакций
2,5x MM (мастер-микс)	1	 фиолетовый	135	270	1060
SD ДНК-полимераза	1	 красный	14	28	112
Контрольная ДНК, 50 нг/мкл	1	 зеленый	30	30	30
Вода для ПЦР	N*	 белый	1400	1400	1400

*Для наборов на 12 реакций N = 1, на 24 реакции N = 1, на 96 реакций N = 2

2.2 Количество проводимых полногеномных амплификаций

Набор реагентов на 12 реакций "WGA Display (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет амплифицировать в одной постановке десять исследуемых образцов, положительный и отрицательный контроль.

Набор реагентов на 24 реакции "WGA Display (24)" содержит реактивы для проведения 24 реакций, что позволяет амплифицировать в одной постановке двадцать два исследуемых образца, положительный и отрицательный контроль.

Набор реагентов на 96 реакций "WGA Display (96)" содержит реактивы для проведения 96 реакций, что позволяет амплифицировать в одной постановке девяносто четыре исследуемых образца, положительный и отрицательный контроль.

2.3 Принцип действия набора

Метод полногеномной амплификации, используемый в наборе, является улучшенной версией дегенеративной олиго-ПЦР (DOP-PCR) с оптимизированными последовательностями праймеров и уникальным ферментом

– SD ДНК-полимеразой. Этот фермент сочетает в себе способность вытеснять нити ДНК с сохранением стабильности при температуре до 92°C. Благодаря данным особенностям этот фермент можно использовать для обеих стадий амплификации (начальный неспецифический отжиг праймеров и дальнейшая амплификация фрагментов) без затрат времени на дополнительное пипетирование.

Набор реагентов содержит мастер-микс 2,5х ММ, в состав которого входят все необходимые реагенты для проведения полногеномной амплификации ДНК образца, за исключением SD ДНК-полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

Для контроля работы набора используются положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит геномную ДНК человека. ОКО содержит воду для ПЦР. В каждой постановке используют ПКО и ОКО.

Оценка наличия продукта амплификации проводится с помощью электрофореза в агарозном геле с обязательным выходом ПКО и отсутствием выхода ОКО.

2.4 Ограничения при применении

Для достижения наилучшего результата амплификации следует избегать использования ДНК, полученной из окрашенных клеток, а также из образцов, фиксированных в формалине.

3 Меры предосторожности

3.1 Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в ПЦР-лаборатории.

3.2 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.

3.3 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.

3.4 Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.

3.5 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки без талька. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

3.6 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

3.7 При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.

3.8 Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

3.9 После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Провести обработку рабочих поверхностей оборудования дезинфицирующими средствами.

3.10 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.

3.11 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.

П р и м е ч а н и е – Набор реагентов не содержит веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

3.12 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». **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, реагентов и оборудования.

4 Оборудование и материалы

4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

- Автоматические дозаторы одноканальные переменного объема, разных объемов (например, DiscoveryComfort, Corning HTL SA, Польша или аналогичные).
- Амплификатор (например, БИС М111-02-48, ООО «БИС-Н», Россия или аналогичный).
- Магнитный штатив для работы с пробирками объемом 0,2 мл (например, ООО «Компания Хеликон», Россия или аналогичный).
- Мини-центрифуга-вортекс (например, «Микроспин» FV-2400 SIA «Biosan», Латвия или аналогичный).
- ПЦР-бокс 2-го класса биологической защиты для работы с ДНК (например, БАВ-ПЦР-Ламинар-С, ЗАО «Ламинарные системы», Россия или аналогичный).
- Камера для горизонтального электрофореза (например, «SE-2», ООО «Компания Хеликон», Россия или аналогичная).
- Источник питания (например, «Эльф-4», ООО «НПО ДНК–Технология», Россия или аналогичный).
- Трансиллюминатор (например, ECX-F20.M, Vilber Lourmat, Франция или аналогичный).
- Термостол холодный (например, Микротермостат М-210, ООО «БИС-Н», Россия или аналогичный).
- Холодильник с морозильной камерой от минус 18 до минус 25°C (например, ATLANT ХМ-6023-031, ЗАО «АТЛАНТ», РБ или аналогичный).

4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

- Контейнер одноразовый, пластиковый для сброса отходов (например, «ЕК-01», ООО «КМ-ПРОЕКТ», Россия или аналогичный).
- Пробирки микроцентрифужные градуированные, объёмом 0,2; 0,5; 1,5 мл (Axugen Inc., США или Bio-Rad Laboratories Inc., США).
- Наконечники для дозаторов универсальные с фильтром, разных объемов (например, Axugen Inc., США или аналогичные).

- Перчатки медицинские одноразовые неопудренные нитриловые или латексные (например, TG MEDICAL Sdn. Bhd., Малайзия или аналогичные).
- Штативы для пробирок разных объёмов (например, Axugen Inc., США или аналогичные).
- Магнитные частицы (например, AMPure XP, Beckman Coulter Inc., США или аналогичные)
- Агароза (cat # AGAF0500, MP Biomedicals, LLC, США или аналогичная)
- Маркер для электрофореза (например, 100 b.p. DNA ladder, BIORON GmbH, Германия или аналогичный).
- Этидий бромид 1% раствор (любой производитель).
- ТАЕ-буфер для электрофореза (любой производитель).

5 Материал для проведения полногеномной амплификации

В качестве материала для проведения полногеномной амплификации используется от 10 до 500 пг геномной ДНК млекопитающих, выделенной из любых видов биологических тканей и жидкостей.

В набор не входят реагенты для выделения ДНК. Для получения ДНК можно использовать наборы реагентов для выделения ДНК различных производителей.

Выделенные образцы ДНК необходимо хранить с соблюдением условий согласно требованиям инструкции используемого набора для выделения ДНК и с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

6 Подготовка к работе

6.1 Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 0,2 мл в соответствии с количеством и маркировкой исследуемых образцов, положительного контрольного образца (ПКО), отрицательного контрольного образца (ОКО).

ВНИМАНИЕ! Помимо исследуемых образцов ДНК в каждой постановке необходимо использовать ПКО и ОКО.

6.2 Рассчитать необходимое количество реагентов для приготовления реакционной смеси с учетом количества амплифицируемых образцов, а также ПКО и ОКО.

Общий объем всех компонентов в одной пробирке составляет 25 мкл. Из них реакционная смесь составляет 20 мкл, исследуемый образец ДНК – 5 мкл.

Объемы реагентов реакционной смеси на одну реакцию представлены в таблице 2.

Таблица 2. Объемы реагентов на одну реакцию

Реагент	Объем реагентов (V), мкл
2,5x MM (мастер-микс)	10
SD ДНК-полимераза	1
Вода для ПЦР	9

П р и м е ч а н и е – В случае, если количество ДНК в 5 мкл образца ниже рекомендуемого (10 пг), следует внести в пробирку больший объем образца, соответственно уменьшив объем воды в реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! В случае использования электрофореза для анализа продуктов амплификации рекомендуется внести в реакционную смесь 15 пг ДНК или более.

Реакционную смесь рекомендуется готовить с небольшим запасом, примерно в 10%, тогда рекомендуемый расчетный коэффициент (k_p) составит 1,1.

Рекомендуемые объемы реагентов реакционной смеси на одну реакцию представлены в таблице 3.

Таблица 3. Рекомендуемые объемы реагентов на одну реакцию

Реагент	Рекомендуемый объем реагентов (V_p), мкл
	$V_p = k_p * V$, ($k_p = 1,1$)
2,5x MM (мастер-микс)	$10 * 1,1 = 11$
SD ДНК-полимераза	$1 * 1,1 = 1,1$
Вода для ПЦР	$9 * 1,1 = 9,9$

Конечные объемы реагентов реакционной смеси для постановки исследуемых образцов определяются по формуле (1):

$$(1). V_k = (N+2) * V_p,$$

где V_k – конечный объем реагента реакционной смеси,

N – число исследуемых образцов в одной постановке,

V_p – рекомендуемый объем реагента реакционной смеси.

Реакционную смесь в одной постановке рекомендуется готовить как минимум для 4 образцов, чтобы предотвратить ошибку пипетирования малых объемов.

ПРИМЕР! Расчет конечных объемов реагентов реакционной смеси для постановки четырех образцов ($N = 4$), ПКО и ОКО.

Рассчитаем конечные объемы реагентов по формуле (1), используя значения рекомендуемых объемов реагентов, представленные в таблице 3.

Результаты расчетов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Конечные объемы реагентов на одну постановку

Реагент	Конечный объем реагентов (V_k), мкл
	$V_k = (N+2) * V_p$
2,5x MM (мастер-микс)	$11 * (4+2) = 66$
SD ДНК-полимераза	$1,1 * (4+2) = 6,6$
Вода для ПЦР	$9,9 * (4+2) = 59,4$

6.3 Подготовить реагенты к работе как указано в таблице 5.

Таблица 5. Подготовка реагентов к работе

Наименование реагента	Цвет крышки пробирки	Подготовка к работе
Вода для ПЦР	 белый	Разморозить при комнатной температуре.
2,5x MM (мастер-микс)	 фиолетовый	Разморозить при комнатной температуре. Перемешать на вортексе и кратко центрифугировать в течение 1-2 сек при 1000 об/мин
Контрольная ДНК, 50 нг/мкл	 зеленый	Кратко центрифугировать в течение 1- 2 сек при 1000 об/мин
SD ДНК-полимераза	 красный	Кратко центрифугировать в течение 1- 2 сек при 1000 об/мин

Не использовать вортекс для SD ДНК-полимеразы, это может привести к инактивации фермента.

Подготовить ПКО. Концентрация контрольной ДНК, включенной в состав набора, составляет 50 нг/мкл. Перед использованием её необходимо разбавить водой для ПЦР до концентрации 25 пг/мкл, используя двустадийное разведение. Например, к воде для ПЦР, объемом 99 мкл добавить 1 мкл контрольной ДНК, перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, после чего к воде для ПЦР объемом 19 мкл добавить 1 мкл полученного раствора контрольной ДНК.

В каждой постановке необходимо использовать свежеприготовленный ПКО.

Разместить подготовленные реагенты на термостоле, предварительно охлажденном до 4°C (для охлаждения реагентов можно использовать лед).

7 Проведение полногеномной амплификации

7.1 Приготовление амплификационной смеси

Слить рассчитанные количества компонентов реакционной смеси в пробирку, перемешать на вортексе и сбросить капли на дно пробирки с помощью короткого центрифугирования в течение 1-2 сек при 1000 об/мин.

ВАЖНО! После приготовления реакционных смесей оставшиеся реагенты сразу убрать на хранение при минус 18°C.

Внести по 20 мкл реакционной смеси в промаркированные пробирки. Добавить 5 мкл или исследуемого образца или ПКО, или ОКО в соответствующие промаркированные пробирки. Конечный объем смеси в каждой пробирке составляет 25 мкл. Кратко перемешать содержимое пробирок на вортексе и собрать капли на дне пробирки с помощью короткого центрифугирования. Поместить пробирки в амплификатор.

7.2 Проведение амплификации

Провести амплификацию в соответствии с программой, представленной в таблице 6.

Таблица 6. Программа амплификации

Температура, °C	Время, сек	Рекомендуемая скорость изменения температуры, °C/сек	Количество циклов
92	120		1
92	40	охлаждение – 0,3	6
30	120	нагрев – 0,3	
68	300		
92	30		14*
62	90		
68	300		
68	300		1

*Допускается увеличение количества циклов, но в результате возможно появление в реакционной смеси неспецифического продукта.

ВНИМАНИЕ! Температура нагрева крышки амплификатора должна составлять 105°C.

7.3 Проведение реамплификации

В случае использования малых количеств исходной ДНК (10–20 пг) или недостаточного выхода продукта ПГА необходимо дополнительно провести реамплификацию в соответствии со следующим протоколом.

Общий объем всех компонентов в одной пробирке составляет 25 мкл. Из них реакционная смесь составляет 24 мкл, реамплифицируемый образец – 1 мкл.

Объемы реагентов реакционной смеси на одну реакцию представлены в таблице 7.

Таблица 7. Объемы реагентов на одну реакцию

Реагент	Объем реагентов (V), мкл
2,5x MM (мастер-микс)	10
SD ДНК-полимераза	1
Вода для ПЦР	13

Слить необходимые объемы реагентов реакционной смеси и реамплифицируемого образца в одну пробирку, перемешать на вортексе и сбросить капли на дно пробирки с помощью короткого центрифугирования. Поместить пробирку в амплификатор.

Провести амплификацию в соответствии с программой, представленной в таблице 8.

Таблица 8. Программа реамплификации

Температура, °C	Время, сек	Рекомендуемая скорость изменения температуры, °C/сек	Количество циклов
92	120		1
92	30		20*
62	90		
68	300		
68	300		1

*Для получения оптимального выхода продукта допускается изменение количества циклов.

ВНИМАНИЕ! Температура нагрева крышки амплификатора должна составлять 105°C.

8 Оценка результатов полногеномной амплификации

Для оценки результата полногеномной амплификации предлагается метод электрофореза в агарозном геле.

Нанести по 5 мкл амплификата на агарозный гель и провести электрофорез.

Успешная визуализация продукта амплификации после электрофореза в агарозном геле возможна при внесении в реакционную смесь 15 пг ДНК или более.

Для примера результат электрофореза образцов с разным содержанием исходного количества ДНК представлен на рисунке 1.

Электрофорез проводили в 1x TAE 2% агарозном геле при 110 В, в течение 40 мин. М – маркер, H2O – ОКО. Указано исходное количество ДНК в образцах.

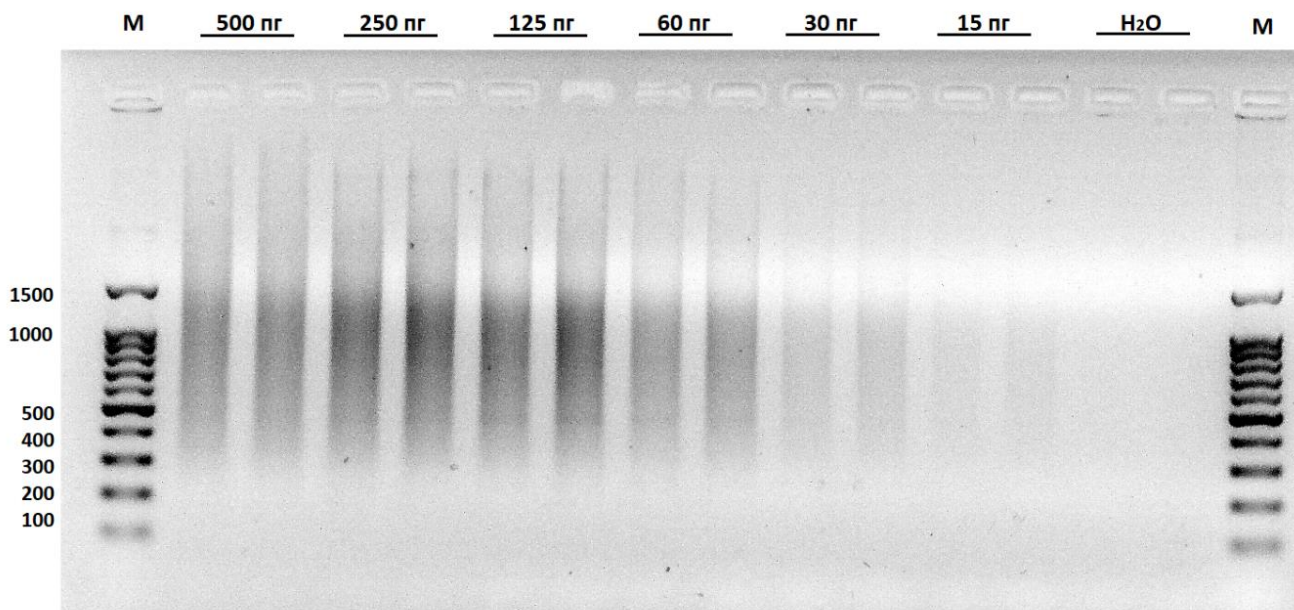


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации.

Далее рекомендуется провести очистку полученного продукта амплификации с использованием магнитных частиц (например, AMPure XP, Beckman Coulter, США) из расчета: объем добавляемых частиц равен 0,8 объема амплификата.

Полученный продукт амплификации может быть использован для дальнейших исследований. Амплификат хранить не более одного месяца при температуре минус 18°C.

9 Возможные проблемы и способы их устранения

Таблица 7. Возможные проблемы и способы их устранения

Проблема	Возможная причина	Устранение
Продукт амплификации образцов не визуализируется.	<ol style="list-style-type: none"> Использование несоответствующих пробирок. Использование ДНК, выделенной из окрашенного материала или фиксированного в формалине. Недостаточное количество исходной ДНК. 	<ol style="list-style-type: none"> Использовать рекомендованные пробирки согласно п. 4.2. Не использовать окрашенный материал или фиксированный в формалине. Провести дополнительно реамплификацию продукта ПГА в соответствии с протоколом п. 7.3.

Продукт амплификации ПКО не визуализируется.	ДНК адсорбировалась на стенки пробирки при хранении.	Подготовить ПКО в меньшем разведении (например, вместо 25 пг/мкл до 50 пг/мкл).
Продукт амплификации ОКО визуализируется.	Контаминация компонентов набора.	Прекратить использование данного набора и утилизировать компоненты.

П р и м е ч а н и е – Если возникают проблемы, не описанные в этом пункте, или принимаемые меры являются неэффективными, обратитесь за консультацией к специалисту по работе с наборами по указанному телефону в п. 13.

10 Требования к транспортированию и хранению

10.1 Транспортирование

Транспортирование набора реагентов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре не выше минус 18°C.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

Набор реагентов следует хранить в холодильнике или морозильной камере при температуре от минус 18 до минус 22°C в течение всего срока годности набора.

Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

11 Указания по применению

11.1 Набор реагентов должен применяться согласно инструкции по применению.

11.2 Перед использованием необходимо полностью разморозить 2,5х ММ (мастер-микс), контрольную ДНК и воду. В процессе постановки эксперимента компоненты набора рекомендуется хранить на термостоле с температурой 4°C или в штативе с охлаждением (на льду).

11.3 Следует избегать излишних (более пяти) циклов замораживания-размораживания мастер-микса. Если набор предполагается использовать на длительном промежутке времени с постановкой небольшого количества реакций, мастер-микс рекомендуется предварительно разделить на аликвоты.

11.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

12 Требования к утилизации

12.1 При использовании набора реагентов образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

12.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и неиспользованные реактивы относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

12.3 Упаковка набора реагентов (коробки картонные) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

13 Гарантийные обязательства

13.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям нормативной и технической документации в течении указанного срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

13.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13.3 Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по телефону: +7 (383)382-99-80.

13.4 Рекламации по вопросам качества набора реагентов "WGA Display" следует направлять в ООО «ДНК-дисплей» по адресу: 630090 г. Новосибирск, ул. Николаева, 13. Тел: +7 (383)382-99-20, e-mail: dna-display@mail.ru

14 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы:

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Обратитесь к инструкции по применению		Дата изготовления (месяц, год)
	Изготовитель		Использовать до (месяц, год)

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, 13

Телефон: (383)382-99-80

E-mail: dna-display@mail.ru

Веб-сайт: dna-display.ru