

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

2024 г.

Регистрационный № 030-0524



МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ НА ОСНОВЕ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА
И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр психического здоровья»,
учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая
лаборатория», государственное научное учреждение «Институт
биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»

Авторы: к.б.н. Голубева Т.С., д.м.н., доцент Докукина Т.В., к.б.н., доцент
Походня Ю.Г., Сяхович В.Э., к.х.н. Сергеев Г.В., к.б.н. Голоенко И.М.,
к.м.н., доцент Обьедков В.Г., Гребень Н.Ф., Гнедько М.Л., Кудин Л.И.,
Походня Е.Н., Кульбацкий В.С., к.х.н. Гайдукевич И.В., Бокуть О.С.

Минск, 2024

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Ю.Л.Горбич

«_24_» ____ 06 _____ 2024 г.

Регистрационный № 030-0524

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ НА ОСНОВЕ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА
И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр психического здоровья»,
учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая
лаборатория», государственное научное учреждение «Институт
биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»

Авторы: к.б.н. Голубева Т.С., д.м.н., доцент Докукина Т.В., к.б.н., доцент
Походня Ю.Г., Сяхович В.Э., к.х.н. Сергеев Г.В., к.б.н. Голоенко И.М.,
к.м.н., доцент Объедков В.Г., Гребень Н.Ф., Гнедько М.Л., Кудин Л.И.,
Походня Е.Н., Кульбацкий В.С., к.х.н. Гайдукевич И.В., Бокуть О.С.

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения пациентов с шизофренией на основе терапевтического лекарственного мониторинга и генетических факторов фармакорезистентности. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с шизофренией.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов, врачей-психотерапевтов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с шизофренией в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или условиях отделения дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Шизофрения (F20 по МКБ-10):

повышенный риск развития осложнений при лечении антипсихотическими лекарственными средствами: избыточная или недостаточная масса тела; дети или подростки; пожилые пациенты (старше 65 лет); печеночная или почечная недостаточность, кардиоваскулярные заболевания;

отсутствие клинического улучшения при приеме антипсихотического лекарственного средства в рекомендуемой дозе в течение двух недель;

наличие рецидива заболевания, несмотря на прием антипсихотического лекарственного средства в рекомендуемой дозе;

наличие нежелательных реакций при клиническом улучшении при приеме антипсихотического лекарственного средства в рекомендуемой дозе.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Соответствуют таковым для медицинского применения медицинских изделий, лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Антипсихотические лекарственные препараты: кветиапин, оланзапин, клозапин, рисперидон, палиперидон, флуфеназин, трифлуоперазин, зуклопентиксол, арипипразол, галоперидол и др. в соответствии с лекарственными формами согласно Республиканскому формуляру лекарственных средств.

2. Медицинские изделия и другие материалы для выделения ДНК и последующего определения генетических маркеров CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*17, CYP2D6*4, CYP1A2*1F, C3435T гена MDR1, C-1019G гена HTR1A, rs1414334 гена HTR2C, C957T гена DRD2, rs1800497 гена ANKK1, Val158Met гена COMT, Val66Met гена BDNF:

наборы для сбора слюны DNA Genotek. Inc. или аналог, либо зонды для взятия буккального эпителия (соскоба с внутренней стороны щеки) для выделения геномной ДНК;

амплификатор для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР);

амплификатор для проведения ПЦР с возможностью детекции продуктов амплификации в режиме реального времени (real-time PCR system);

ламинарный бокс;

высокоскоростная мини-центрифуга, диапазон регулирования скорости вращения – от 1000 до 17000 g;

мини-центрифуга-вортекс, 2000 g;

шейкер типа мультивортекс или аналог;

комплект автоматических дозаторов переменного объема (0,1-2 мкл, 0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 200-1000 мкл);

холодильник, поддерживаемая температура: от +2 до +8 °С в холодильной камере и от минус 25 °С до минус 15 °С в морозильной камере;

настольный термостат для пробирок типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 мл, поддерживаемая температура от +25 °С до +100 °С;

набор для выделения ДНК из клеток буккального эпителия или из слюны с использованием мини-спин колонок;

вода сверхчистая (тип I);

10-кратные буферные растворы для амплификации: буферный раствор S, содержащий 500 мМ Трис-НСl, 500 мМ КСl, 1% Твин-20; буферный раствор D, содержащий 600 мМ Трис-НСl, 170 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% Твин-20;

раствор 25 мМ MgCl₂;

смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (концентрация каждого дНТФ 2,5 мМ);

олигонуклеотидные праймеры;

флуоресцентные зонды для ПЦР в режиме реального времени;

Тақ ДНК-полимераза (5ед/мкл);

эндонуклеазы рестрикции AvaII, KpnI, SmaI, SfaNI, BstNI, ApaI, MboI, BtsCI, BsaAI;

10-кратные буферные растворы для эндонуклеаз рестрикции;

система и реагенты для электрофореза в геле;
наконечники для дозаторов (от 0,5 до 1000 мкл);
микропробирки типа «Eppendorf» вместимостью 0,5 и 1,5 мл, ПЦР-пробирки вместимостью 0,2 мл (отдельные и в стрипах по 8 шт.);
штативы для микропробирок, стеклянная химическая посуда.

3. Медицинские изделия и другие материалы для получения образца плазмы крови:

шприцы одноразовые стерильные (объемом 5 мл), держатели, пробирки вакуумные объемом 5 мл для взятия крови из вены;

стерильные иглы, стерильные пластиковые или стеклянные пробирки для взятия ликвора;

пробирки типа «эппендорф» (объемом 1,5 мл), криопробирки (объемом 2 мл);

пробирки пластиковые (объемом 10 мл);

стаканы мерные вместимостью 100, 200, 500 мл, цилиндры мерные вместимостью 100 мл;

холодильник бытовой, поддерживаемая температура от +2 °С до +8 °С в холодильной камере и от минус 25 °С до минус 15 °С в морозильной камере;

морозильник низкотемпературный, поддерживаемая температура от минус 80 °С до минус 75 °С;

дозаторы пипеточные переменного объема от 0,5 до 1000 мкл;

секундомер механический лабораторный;

центрифуга типа «Вортекс», 2000 × g;

термостат, поддерживаемая температура от +18 °С до + 60 °С;

весы аналитические электронные с рабочим диапазоном от не более 1 мг и погрешностью взвешивания не более ± 0,00006 г;

штатив для пробирок лабораторный;

бумага фильтровальная;

вода деионизованная, дистиллированная высокой степени очистки.

4. Медицинские изделия, материалы, реактивы и оборудование для количественного определения антипсихотических лекарственных средств в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС):

высокоэффективный жидкостной хроматограф с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» или «квадруполь-орбитальная ловушка»;

центрифуга лабораторная со встроенной системой охлаждения и относительным центробежным ускорением не менее $21\ 380 \times g$;

вихревой смеситель универсальный (вортекс);

колонка хроматографическая, тип сорбента C18, размер 50 мм × 2,1 мм, размер частиц 3 мкм;

стандартные образцы для ВЭЖХ: кветиапин, оланзапин, клозапин, рисперидон, палиперидон, флуфеназин, трифлуоперазин, зуклопентиксол, арипипразол, дегидроарипипразол, галоперидол, цетиризин-D8 (в качестве внутреннего стандарта);

метанол для ВЭЖХ, чистота не менее 99,9 %;

ацетонитрил для ВЭЖХ, чистота не менее 99,9 %;

муравьиная кислота, чистота не менее 98,0 %,

вода деионизованная.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Получение образца плазмы крови

Получение образца крови, ее транспортировка, получение плазмы крови производится согласно приказу Министерства Здравоохранения

Республики Беларусь «О порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований» (10.11.2015 № 1123).

Взятие крови следует производить после установления равновесной концентрации антипсихотического лекарственного препарата, то есть в день по прошествии четырех периодов полувыведения препарата или его активного метаболита (см. инструкцию по применению соответствующего лекарственного средства), натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в количестве 9 мл в пробирки вакуумные для взятия крови из вены.

Образцы плазмы крови следует делить на 2 порции в отдельные криопробирки объемом 2 мл с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

2. Определение концентрации антипсихотических лекарственных средств в плазме крови.

Концентрацию антипсихотических лекарственных средств в плазме крови определять по методике согласно приложению 1.

3. Фармакогенетическое тестирование.

Образец слюны для выделения геномной ДНК помещать в специальные пробирки согласно рекомендациям производителя.

Определение генетических маркеров методом ПЦР в режиме реального времени, а также методом ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов – разрезание амплифицированных фрагментов ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путём гель-электрофореза) осуществлять по методике согласно приложению 2.

4. Терапевтический лекарственный мониторинг

При отсутствии клинического эффекта в течение двух недель приема антипсихотического лекарственного средства или при наличии

нежелательных реакций и при установлении концентрации антипсихотического лекарственного средства в плазме крови вне терапевтического диапазона (таблица 1) рекомендуется изменение дозы лекарственного средства или смена лекарственного средства с учетом результатов фармакогенетического тестирования согласно таблице 2.

Таблица 1 – Диапазоны концентраций антипсихотиков в плазме крови

Антипсихотик	Рекомендуемый терапевтический диапазон, нг/мл	Токсический предел
Кветиапин	100-600	1500
Клозапин	350-600	1500
Оланзапин	20-80	150
Рisperидон	20-60*	150
Палиперидон	-	120
Галоперидол	2-17	30
Зуклопентиксол	5-100	150
Флуфеназин	1-10	100
Арипипразол	100-500*	1500
Дегидроарипипразол	-	1000
Трифлуоперазин	5-10	100

* включая концентрацию активного метаболита.

Таблица 2 – Алгоритм интерпретации наличия генетических маркеров, связанных с фармакокинетикой антипсихотиков

Ген	Название генетического маркера	Изменение фармакологического ответа	Клинические рекомендации
Ген CYP2C9	Полиморфизм CYP2C9*2 (430C>T) rs1799853	Генотип ТТ или СТ ассоциирован со снижением скорости метаболизма лекарственных средств-субстратов изофермента цитохрома, возникновения нежелательных реакций	Увеличен риск возникновения нежелательных реакций. Рекомендуется выбирать дозу на 30-50% меньше средней терапевтической при назначении лекарственного средства перфеназин

	Полиморфизм CYP2C9*3 (1075A>C) rs1057910	Генотип CC или AC ассоциирован со снижением скорости метаболизма лекарственных средств- субстратов изофермента цитохрома, возникновения нежелательных реакций	
Ген CYP2C19	Полиморфизм CYP2C19*2 (681G>A) rs4244285	Генотип AA или GA ассоциирован со снижением скорости метаболизма лекарственных средств- субстратов изофермента цитохрома, возникновения нежелательных реакций	Увеличен риск возникновения нежелательных реакций. Рекомендуется выбирать дозу на 30-50% меньше средней терапевтической при назначении лекарственных средств зипрасидон, клозапин, галоперидол, перфеназин
	Полиморфизм CYP2C19*17 (-806C>T) rs12248560	Генотип TT ассоциирован с повышением скорости метаболизма лекарственных средств-субстратов изофермента цитохрома	При снижении эффективности лечения корректировать дозу в сторону увеличения при назначении лекарственных средств зипрасидон, клозапин, галоперидол, перфеназин
Ген CYP2D6	Полиморфизм CYP2D6*4 (1846G>A) rs3892097	Генотип AA или GA ассоциирован со снижением скорости метаболизма лекарственных средств- субстратов изофермента цитохрома, риск возникновения нежелательных реакций	Увеличен риск возникновения нежелательных реакций. Рекомендуется выбирать дозу на 30-50% меньше средней терапевтической при назначении лекарственных средств арипипразол, сертиндол, азенапин, клозапин, карипразин, галоперидол, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, зуклопентиксол, алимемазин, флупентиксол, хлорпротиксен. Возможно снижение эффективности лечения рисперидоном
Ген CYP1A2	Полиморфизм CYP1A2*1F (-163C>A) rs762551	Генотип AA ассоциирован с повышением индуцибельности фермента, увеличением вероятности повышения скорости метаболизма лекарственных средств-субстратов изофермента цитохрома	При снижении эффективности лечения корректировать дозу в сторону увеличения при назначении лекарственных средств оланзапин, зипрасидон, азенапин, клозапин, галоперидол, трифлуоперазин, перфеназин, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, алимемазин, хлорпротиксен

Ген MDR1	Полиморфизм C3435T rs1045642	<p>Генотип СС ассоциирован со снижением вероятности проникновения лекарственных средств-субстратов Р-гликопротеина через гематоэнцефалический барьер</p> <p>Генотип ТТ ассоциирован с повышением вероятности проникновения лекарственных средств-субстратов Р-гликопротеина через гематоэнцефалический барьер, риск возникновения нежелательных реакций</p>	<p>При снижении эффективности лечения корректировать дозу в сторону увеличения при назначении лекарственных средств рисперидон, палиперидон, оланзапин, кветиапин, арипипразол, сертиндол, зипрасидон, азенапин, клозапин, галоперидол, трифлуоперазин, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, зуклопентиксол, алимемазин, флупентиксол, хлорпротиксен</p> <p>Рекомендуется не повышать дозу выше средней терапевтической при назначении лекарственных средств рисперидон, палиперидон, оланзапин, кветиапин, арипипразол, сертиндол, зипрасидон, азенапин, клозапин, галоперидол, трифлуоперазин, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, зуклопентиксол, алимемазин, флупентиксол, хлорпротиксен</p>
----------	------------------------------	---	---

Если проведена коррекция лечения, провести повторное измерение концентрации антипсихотического лекарственного средства в плазме крови после установления его равновесной концентрации. При нахождении концентрации антипсихотического лекарственного средства в плазме крови вне терапевтического диапазона сменить лекарственное средство.

При отсутствии клинического эффекта в течение двух недель приема антипсихотического лекарственного средства после коррекции лечения или при наличии таких побочных эффектов как увеличение массы тела, резистентность к инсулину, гиперпролактинемия корректировать лечение с учетом результатов фармакогенетического тестирования согласно таблице 3.

Таблица 3 – Алгоритм интерпретации наличия генетических маркеров, связанных с фармакодинамикой антипсихотиков

Ген	Название генетического маркера	Изменение активности рецептора	Изменение фармакологического ответа	Клинические рекомендации
Ген HTR1A рецептора 5-HT _{1A}	Полиморфизм rs6295 C-1019G	Влияние на работу серотонинового рецептора 5-HT _{1A}	Генотип GG и CG ассоциирован с устойчивостью к лечению антипсихотиками	При наличии клинических показаний* рекомендовано применение немедикаментозных методов лечения
Ген HTR2C рецептора 5-HT _{2C}	Полиморфизм rs1414334 (C>G, интронный вариант)	Влияние на работу серотонинового рецептора 5-HT _{2C}	Наличие генотипа CG или CC повышает вероятность развития резистентности к инсулину и набора веса при приеме антипсихотиков у пациентов с шизофренией	При наличии клинических показаний* рекомендуется применять зипрасидон, арипипразол, азеналин
Ген DRD2 D ₂ -рецептора	Полиморфизм rs6277 C957T	Влияние на работу дофамина D ₂ -рецептора	Генотип CC связан со снижением ответа на арипипразол при лечении шизофрении Генотип CC или СТ связан с повышенной вероятностью набора веса при приеме клозапина оланзапина, рисперидона для лечения шизофрении Генотип CC связан с повышенной вероятностью развития резистентности к инсулину при приеме рисперидона у детей	При наличии клинических показаний* рекомендуется применять лекарственные средства, отличные от арипипразола При наличии клинических показаний* рекомендуется применять зипрасидон, азеналин При назначении рисперидона у детей контролировать показатели уровня глюкозы в крови

Ген ANKK1 анкиринкиназы 1, тесно связанной с дофаминовым D ₂ -рецептором	TaqI полиморфизм (с.2137 G>A, E713K (E [GAG] > K [AAG]), гена ANKK1 анкиринкиназы 1, rs1800497	Влияние на работу дофаминового D ₂ -рецептора	Генотип GA (A1/A2) или AA (A1/A1) связан с повышенной вероятностью набора веса при приеме антипсихотиков, в т.ч. оланзапина или клозапина	При наличии клинических показаний* рекомендуется применять ziprasидон, аripипразол, аzenапин
Ген COMT	Полиморфизм Val158Met rs4680 (G>A)	Влияние на активность катехол-О-метилтрансферазы (фермент, участвующий в разрушении дофамина, эпинефрина и норэпинефрина)	У пациентов с шизофренией и генотипом AA или AG повышен риск развития tardивной дискенизии при приеме антипсихотиков и снижен ответ на данные лекарственные средства	При наличии клинических показаний* рекомендовано применение немедикаментозных методов лечения
Ген BDNF	Полиморфизм Val66Met rs6265 (C>T)	Влияние на работу мозгового нейротрофического фактора BDNF	У носителей генотипа CC повышен риск набора веса при лечении антипсихотиками по сравнению с генотипами TT и CT У пациентов с генотипов CT и TT увеличена степень проявления гиперпролактинемии при лечении risперидоном	При наличии клинических показаний* рекомендуется применять zipрасидон, аripипразол, аzenапин Рекомендуется применение лекарственных средств, отличных от risперидона

* клинический протокол «Оказание медицинской помощи пациентам с шизофренией, шизотипическими и бредовыми расстройствами (взрослое и детское население)», утвержденный постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.11.2022 № 108

Эффективность лечения оценивать согласно клиническому протоколу «Оказание медицинской помощи пациентам с шизофренией, шизотипическими и бредовыми расстройствами (взрослое и детское население)», утвержденному постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.11.2022 № 108.

При отсутствии клинического эффекта в течение двух недель приема антипсихотического лекарственного средства после коррекции лечения использовать рекомендации, содержащиеся в настоящей инструкции.

Выполнение клинических рекомендаций возможно только при наличии у пациента описанных выше соответствующих фенотипических проявлений изменения фармакологического ответа (Таблица 2, 3).

При наличии нескольких генетических маркеров у одного пациента, следует учитывать рекомендации по каждому пункту.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА

Несоблюдение последовательности проведения этапов и технологии применения метода может приводить к потере биологического материала. Для исключения ошибок необходимо соблюдать правила и рекомендации, изложенные в данной инструкции. Для обеспечения достоверности результатов образцы следует исследовать четырехкратно.

Ошибки при оценке результатов детекции антипсихотического лекарственного средства методом ВЭЖХ-МС/МС могут быть обусловлены нарушениями технологии приготовления анализируемых образцов (пробоподготовки), что приводит к получению ложноотрицательных результатов, или использованием реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся.

Возможные осложнения соответствуют таковым, изложенным в инструкциях по медицинскому применению лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИПСИХОТИЧЕСКИХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ КВЕТИАПИНА, ОЛАНЗАПИНА,
КЛОЗАПИНА, РИСПЕРИДОНА, ПАЛИПЕРИДОНА, ФЛУФЕНАЗИНА,
ТРИФЛУОПЕРАЗИНА, ЗУКЛОПЕНТИКСОЛА, АРИПИПРАЗОЛА,
ДЕГИДРОАРИПИПРАЗОЛА, ГАЛОПЕРИДОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА

1 Приготовление растворов реактивов

1.1 Приготовление подвижной фазы А (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в воде)

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л водой деионизированной примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки 1,0 л водой деионизированной, тщательно перемешать, перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °С).

1.2 Приготовление подвижной фазы В (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле)

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л ацетонитрилом примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки ацетонитрилом, тщательно перемешать, перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °С).

1.3 Приготовление смеси вода деионизированная : ацетонитрил в объемном соотношении 50 : 50

Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл ацетонитрила, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

1.4 Приготовление смеси вода деионизированная : ацетонитрил в объемном соотношении 20 : 80

Мерным цилиндром объемом 100 мл отмерить 100 мл воды деионизированной перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить объем ацетонитрила 400 мл, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

1.5 Приготовление смеси вода деионизированная : ацетонитрил в объемном соотношении 70 : 30 (для промывки иглы хроматографа)

Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить 500 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 350 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 150 мл метанола, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

2 Приготовление рабочих растворов стандартных образцов

2.1 Приготовление концентрированных растворов с концентрацией 1 мг/мл

Взвесить 0,001 г (точная навеска) с точностью до 0,00006 г стандартного образца (кветиапин, оланзапин, клозапин, рисперидон, палиперидон, флуфеназин, трифлуоперазин, зуклопентиксол, арипипразол, дегидроарипипразол, галоперидол, цетиризина-D₈), перенести в мерную колбу вместимостью 1 мл, добавить приблизительно 0,5 мл метанола, перемешать, обеспечив полное растворение вещества, довести уровень раствора до метки метанолом, перемешать, перенести во флакон из темного стекла вместимостью 1 мл с закручивающейся крышкой (конечная концентрация стандартного образца составляет 1 000 000 нг/мл, срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

2.2 Приготовление рабочего раствора смеси стандартных образцов (арипипразола, дегидроарипипразола, кветиапина, клозапина) с концентрацией 100 000 нг/мл

Разбавить концентрированные растворы данных веществ в 10 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % ацетонитрила, внести по 100 мкл каждого концентрированного раствора анализируемого вещества, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор AP-1 100 000, концентрация кветиапина, клозапина, арипипразола, дегидроарипипразола составляет 100 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

2.3 Приготовление рабочего раствора смеси стандартных образцов (кветиапина, клозапина, дегидроарипипразола, арипипразола) с концентрацией 10 000 нг/мл

Разбавить AP-1 100 000 в 10 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % ацетонитрилом, внести раствора AP-1 100 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор AP-1 10 000, концентрация кветиапина, клозапина, арипипразола, дегидроарипипразола составляет 10 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

2.4 Приготовление рабочего раствора смеси стандартных образцов (кветиапина, клозапина, арипипразола, дегидроарипипразола) с концентрацией 1 000 нг/мл:

Разбавить растворы AP-1 100 000 в 100 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % ацетонитрилом, внести 10 мкл раствора AP-1 100 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор AP-1 1 000, концентрация кветиапина, клозапина, арипипразола, дегидроарипипразола составляет 1 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

2.5 Приготовление рабочего раствора смеси стандартных образцов (оланзапина, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, рисперидона, палиперидона, галоперидола) с концентрацией 10 000 нг/мл:

Разбавить концентрированные растворы оланзапина, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, рисперидона, палиперидона, галоперидола в 100 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью

1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % ацетонитрилом, внести по 10 мкл каждого концентрированного раствора анализируемого вещества, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор AP-2 10 000, концентрация оланзапина, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, рисперидона, палиперидона, галоперидола составляет 10 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

2.6 Приготовление рабочего раствора смеси стандартных образцов (оланзапина, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, рисперидона, палиперидона, галоперидола) с концентрацией 1 000 нг/мл

Разбавить растворы AP-2 10 000 в 10 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % ацетонитрилом, внести 100 мкл раствора AP-2 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор AP-2 1 000, концентрация флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, дегидроарипипразола, галоперидола составляет 1 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

2.7 Приготовление рабочих растворов стандартных образцов кветиапина, оланзапина, клозапина, рисперидона, палиперидона, арипипразола, флуфеназина, галоперидола, трифлуоперазина, зуклопентиксола, дегидроарипипразола для приготовления калибровочных образцов (Cal) и положительных образцов контроля качества (QC)

Рабочие растворы кветиапина, оланзапина, клозапина, рисперидона, палиперидона, арипипразола, флуфеназина, трифлуоперазина,

зуклопентиксола, дегидроарипипразола, галоперидола для приготовления калибровочных образцов и образцов QC готовятся путем разбавления рабочих растворов AP-1 100 000, AP-1 10 000, AP-1 1 000 и AP-2 10 000, AP-2 1 000 в мерных колбах вместимостью 500 мкл смесью вода деионизированная : ацетонитрил в объемном соотношении 50 : 50 (п. 1.3) по приведенным в Таблицах 1.1-1.4, соответственно, схемам.

Таблица 1.1 – Схема приготовления рабочих растворов кветиапина, клозапина, арипипразола, дегидроарипипразола для приготовления калибровочных образцов

Уровень точки калибровочной кривой	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления калибровочных образцов
Cal-1	AP-1 1 000	10	20	ST-Cal-1-AP1
Cal-2	AP-1 1 000	50	100	ST-Cal-2-AP1
Cal-3	AP-1 1 000	100	200	ST-Cal-3-AP1
Cal-4	AP-1 100 000	10	2 000	ST-Cal-4-AP1
Cal-5	AP-1 100 000	50	10 000	ST-Cal-5-AP1
Cal-6	AP-1 100 000	100	20 000	ST-Cal-6-AP1

Таблица 1.2 – Схема приготовления рабочих растворов кветиапина, клозапина, арипипразола, дегидроарипипразола для приготовления образцов QC

Уровень QC	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления образцов QC
QC-AP-L	AP-1 10 000	50	1 000	ST-QC-L-AP1
QC-AP-M	AP-1 100 000	20	4 000	ST-QC-M-AP1
QC-AP-H	AP-1 100 000	80	16 000	ST-QC-H-AP1

Таблица 1.3 – Схема приготовления рабочих растворов оланзапина, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, рисперидона, палиперидона, галоперидола для приготовления калибровочных образцов

Уровень точки калибровочной кривой	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления калибровочных образцов
Cal-1	AP-2 1 000	10	20	ST-Cal-1-AP2
Cal-2	AP-2 1 000	30	60	ST-Cal-2-AP2
Cal-3	AP-2 10 000	10	200	ST-Cal-3-AP2
Cal-4	AP-2 10 000	15	300	ST-Cal-4-AP2
Cal-5	AP-2 10 000	25	500	ST-Cal-5-AP2
Cal-6	AP-2 10 000	100	2 000	ST-Cal-6-AP2

Таблица 1.4 – Схема приготовления рабочих растворов оланзапина, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, рисперидона, палиперидона, галоперидола для образцов QC

Уровень QC	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления образцов QC
QC-AP-L	AP-2 1 000	50	100	ST-QC-L-AP2
QC-AP-M	AP-2 10 000	20	400	ST-QC-M-AP2
QC-AP-H	AP-2 10 000	50	1 000	ST-QC-H-AP2

2.8 Приготовление раствора внутреннего стандарта (цетиризин-D₈) с концентрацией 400 нг/мл

Разбавить концентрированный раствор цетиризина-D₈ в 100 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % ацетонитрилом, внести 10 мкл концентрированного раствора цетиризина-D₈, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать.

Получили раствор цетиризина-D₈ (СЕТ-D₈ 10 000), концентрация внутреннего стандарта составляет 10 000 нг/мл (срок годности раствора - 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже). Затем мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % ацетонитрилом, внести 40 мкл раствора СЕТ-D₈ 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор СЕТ-D₈ 400 с концентрацией внутреннего стандарта 400 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

3 Подготовка образцов к анализу

3.1 Размораживание образцов

Все образцы плазмы крови перед началом пробоподготовки размораживаются путем выдерживания в водяном термостате при 20 °С ± 5 °С. После размораживания образцы тщательно перемешиваются.

3.2 Приготовление испытуемых образцов

Для приготовления отрицательных образцов контроля качества, калибровочных образцов и образцов QC используется плазма крови добровольцев, заведомо не содержащая анализируемый компонент («холостая» плазма крови).

Калибровочные образцы готовят путем разбавления соответствующих растворов анализируемых веществ «холостой» плазмой крови.

В пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл внести 50 мкл соответствующего испытуемого образца / отрицательного образца контроля качества («холостая» плазма крови) / образцов QC / калибровочного образца плазмы крови.

Для приготовления калибровочных образцов и образцов QC необходимо к 190 мкл «холостой» плазмы крови прилить 10 мкл соответствующего раствора, согласно Таблицам 1.5-1.8, тщательно перемешать образцы на вихревом смесителе (вортекс).

Таблица 1.5 – Схема приготовления калибровочных образцов кветиапина, клозапина, арипипразола, дегидроарипипразола

Код добавляемого рабочего раствора для приготовления калибровочных образцов	Объем добавляемого рабочего раствора, мкл	Объем «холостой» плазмы крови, мкл	Условная концентрация аналита в полученном калибровочном образце, нг/мл	Маркировка полученного калибровочного образца
ST-Cal-1-AP1	10	190	1	Cal-1-AP1-ДДММГГ
ST-Cal-2-AP1	10	190	5	Cal-2-AP1-ДДММГГ
ST-Cal-3-AP1	10	190	10	Cal-3-AP1-ДДММГГ
ST-Cal-4-AP1	10	190	100	Cal-4-AP1-ДДММГГ
ST-Cal-5-AP1	10	190	500	Cal-5-AP1-ДДММГГ
ST-Cal-6-AP1	10	190	1 000	Cal-6-AP1-ДДММГГ

Таблица 1.6 – Схема приготовления образцов QC кветиапина, клозапина, арипипразола, дегидроарипипразола

Код добавляемого рабочего раствора для приготовления образцов QC	Объем добавляемого рабочего раствора, мкл	Объем «холостой» плазмы крови, мкл	Условная концентрация аналита в полученном образце QC, нг/мл	Маркировка полученных образцов
ST-QC-L-AP1	10	190	50	QC-AP1-L-ДДММГГ
ST-QC-M-AP1	10	190	200	QC-AP1-M-ДДММГГ
ST-QC-H-AP1	10	190	800	QC-AP1-H-ДДММГГ

Таблица 1.7 – Схема приготовления калибровочных образцов оланзапина, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, рисперидона, палиперидона, галоперидола

Код добавляемого рабочего раствора для приготовления калибровочных образцов	Объем добавляемого рабочего раствора, мкл	Объем «холостой» плазмы крови, мкл	Условная концентрация аналита в полученном калибровочном образце, нг/мл	Маркировка полученного калибровочного образца
ST-Cal-1-AP2	10	190	1	Cal-1-AP2-ДДММГГ
ST-Cal-2-AP2	10	190	3	Cal-2-AP2-ДДММГГ
ST-Cal-3-AP2	10	190	10	Cal-3-AP2-ДДММГГ
ST-Cal-4-AP2	10	190	15	Cal-4-AP2-ДДММГГ
ST-Cal-5-AP2	10	190	25	Cal-5-AP2-ДДММГГ
ST-Cal-6-AP2	10	190	100	Cal-6-AP2-ДДММГГ

Таблица 1.8 – Схема приготовления образцов QC оланзапина, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, рисперидона, палиперидона, галоперидола

Код добавляемого рабочего раствора для приготовления образцов QC	Объем добавляемого рабочего раствора, мкл	Объем «холостой» плазмы крови, мкл	Условная концентрация аналита в полученном образце QC, нг/мл	Маркировка полученных образцов
ST-QC-L-AP2	10	190	5	QC-AP2-L-ДДММГГ
ST-QC-M-AP2	10	190	20	QC-AP2-M-ДДММГГ
ST-QC-H-AP2	10	190	50	QC-AP2-H-ДДММГГ

Во все образцы добавить 10 мкл раствора СЕТ-D₈ 400 (10 мкл ацетонитрила в случае отрицательного образца контроля качества), закрыть, тщательно перемешать образцы на вихревом смесителе.

Добавить в эппендорфы 150 мкл смеси ацетонитрил : вода в соотношении 80/20 по объему (п. 1.4), закрыть пробирки, тщательно перемешать образцы на вихревом смесителе.

Центрифугировать образцы в течение 15 мин при 15 000 об/мин и температуре 4 °С.

В стеклянную виалу вместимостью 1,5 мл со вставкой внести 90 мкл раствора для приготовления проб.

Отобрать 10 мкл раствора над осадком, полученного после центрифугирования, и перенести в ту же виалу, закрыть крышкой и перемешать на шейкере в течение 5 мин;

Полученный раствор использовать для проведения инструментального анализа.

4 Хромато-масс-спектрометрический анализ

4.1 Параметры хроматографа

- температура термостата колонки: 30 °С;
- объем вводимой пробы: 10 мкл;
- скорость потока элюента: 0,250 мл/мин;
- подвижная фаза А: раствор 0,1 % муравьиной кислоты в воде;
- подвижная фаза Б: раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле;
- режим элюирования: градиентный (представлен в Таблице 1.9);
- продолжительность анализа: 14 мин.

Таблица 1.9 – Схема используемого градиента

№	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	Подвижная фаза А (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в воде), %	Подвижная фаза Б (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле), %
1	0,00	0,250	95,0	5,0
2	2,00	0,250	95,0	5,0
3	7,00	0,250	0,0	100,0
4	8,00	0,250	0,0	100,0
5	9,00	0,250	95,0	5,0
6	14,00	0,250	95,0	5,0

4.2 Параметры устройства автоматического ввода проб

- температура в устройстве автоматического ввода проб: 10 °С;
- растворитель в промывочной емкости: смесь ацетонитрил: вода деионизированная в объемном соотношении 50:50 (п. 1.3);
- объем промывки шприца: 300 мкл;
- режим промывки: после закола образца;
- высота закола: 2 мм.

4.3 Параметры масс-спектрометрического детектора

- режим детектирования: Full scan;
- тип ионизации: HESI;
- режим ионизации: положительная;
- температура ион-проводящего капилляра: 350 С;
- температура осушающего газа: 300 С;
- диапазон сканирования: 100-500 m/z;
- разрешение: 70 000 FWHM;
- точность детектирования: 5 ppm.

Проводят поиск целевых соединений и их метаболитов, с использованием данных m/z ионов соответствующих целевых соединений (± 5 ppm).

Параметры детектирования антипсихотических лекарственных средств и внутреннего стандарта (цетиризина-D₈) представлены в Таблице 1.10.

Таблица 1.10 – Параметры детектирования ионов антипсихотических лекарственных средств (кветиапина, оланзапина, клозапина, рисперидона, палиперидона, арипипразола, флуфеназина, трифлуоперазина, зуклопентиксола, дегидроарипипразола, галоперидола) и цетиризина-D₈

Определяемое соединение	Ожидаемое время удерживания, мин	Режим сканирования	Характеристические ионы (m/z)
Клозапин	5,35	положительный	327,13710
Кветиапин	5,53	положительный	384,17402
Оланзапин	4,35	положительный	313,14814
Рисперидон	5,30	положительный	411,21908
Палиперидон	5,34	положительный	427,21399
Флуфеназин	6,09	положительный	438,18214
Трифлуоперазин	6,18	положительный	408,17157
Зуклопентиксол	6,03	положительный	401,14488
Арипипразол	6,01	положительный	448,15530
Дегидроарипипразол	5,91	положительный	446,13965
Галоперидол	5,85	положительный	376,14741
Цетиризин-D ₈	6,07	положительный	397,21286

4.4 Выполнение хромато-масс-спектрометрического анализа и требования к аналитической серии

Испытуемые, отрицательные образцы контроля качества, калибровочных образцы и образцы QC анализируют в вышеуказанных условиях, получая по одной хроматограмме.

Для хромато-масс-спектрометрического анализа в условиях данной процедуры используют режим полного сканирования ионов (Full Scan). Полученные ВЭЖХ-МС-данные анализируют с помощью программного приложения Xcalibur, версия 4.1 или выше (Thermo Fisher Scientific, США) и «Tune», версия 2.9 или выше (Thermo Fischer Scientific Inc., США).

По результатам анализа выносят заключение о содержании в исследуемом образце анализируемого вещества.

4.5 Расчет концентрации

С помощью программного обеспечения используемой хромато-масс-спектрометрической системы проводится интегрирование хроматографических пиков аналитов и внутреннего стандарта, определяется относительная площадь пика (отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта). Строится калибровочная кривая в координатах «Относительная площадь пика» и «Концентрация аналита в плазме, нг/мл». На основании полученной калибровочной кривой определяется содержание аналитов в испытуемом образце. Для определения концентрации используется модель взвешенной ($1/x^2$) квадратичной регрессии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

1 Определение генетических маркеров СУР2С9*2, СУР2С9*3 гена СУР2С9

Применяется метод ПЦР-ПДРФ. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, использовать олигонуклеотидные праймеры (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК гена СУР2С9

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
СУР2С9*2	F	gTATTTTggCCTgAAACCCATA
	R	ACCCTTggTTTTTCTCAACTC
СУР2С9*3	F	gCACgAggTCCAgAggTAC
	R	ACAAACTTACCTTgggAATgAgA

1.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10 x буферный раствор D, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Приготовить реакционные смеси для каждого полиморфизма согласно таблице 2 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец

– 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.2 – Состав реакционной смеси для амплификации СУР2С9*2, СУР2С9*3

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 х буферный раствор D	2,5 мкл	1х
MgCl ₂ (25 мМ)	2,0 мкл	2 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Тақ ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

2. Реакционные смеси перемешать пипетированием.
3. В каждую ПЦР-пробирку объёмом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объёме 2 мкл.
4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл соответствующей реакционной смеси.
5. Промаркировать ПЦР-пробирки.
6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».
7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».
8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой. Программу амплификации задать согласно таблице 3.

Таблица 2.3 – Программа амплификации фрагментов СУР2С9*2, СУР2С9*3

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	30 сек	40 циклов
61 °С	30 сек	
72 °С	45 сек	
72 °С	5 мин	1 цикл
10 °С	∞	хранение

1.2 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов СУР2С9*2

10 x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10 x буферный раствор при комнатной температуре.

1. Для проведения рестрикционного анализа ампликонов СУР2С9*2 эндонуклеазой рестрикции *AvaII* (в рестрикционном буферном растворе, идущем в комплекте) приготовить рестрикционную смесь согласно таблице 4 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объём рестрикционной смеси в расчёте на один компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.4 – Состав рестрикционной смеси для рестрикционного анализа СУР2С9*2

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10x буферный раствор	3 мкл	1x
<i>AvaII</i>	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестрикционной смеси.

3. Рестриктию проводить при температуре 37 °С в течение 2 часов.

1.3 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов СУР2С9*3

10 х буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10 х буферный раствор при комнатной температуре.

1. Для проведения рестрикционного анализа ампликонов СУР2С9*3 эндонуклеазой рестрикции *KpnI* (в рестрикционном буферном растворе, идущем в комплекте) приготовить рестрикционную смесь согласно таблице 5 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объём рестрикционной смеси в расчёте на один компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестрикционной смеси.

3. Рестриктию проводить при температуре 37 °С в течение 2 часов.

Таблица 2.5 – Состав рестрикционной смеси для рестрикционного анализа СУР2С9*3

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10х буферный раствор	3 мкл	1х
<i>KpnI</i>	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

1.4 Визуализация продуктов рестрикции и интерпретация результатов

Разделение продуктов рестрикционного анализа CYP2C9*2 проводить методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле.

Различные генотипы CYP2C9*2 характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: СС генотип – 397 и 57 п.н., СТ генотип – 454, 397 и 57 п.н., ТТ генотип – 454 п.н.

Разделение продуктов рестрикционного анализа CYP2C9*3 проводить методом вертикального гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле.

Различные генотипы CYP2C9*3 характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: АА генотип – 104 п.н., АС генотип – 104, 85 и 19 п.н., СС генотип – 85 и 19 п.н.

2 Определение полиморфизмов CYP2C19*2, CYP2C19*17 гена CYP2C19

Применяется метод ПЦР-ПДРФ. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, использовать олигонуклеотидные праймеры (таблица 2.6).

Таблица 2.6 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК гена CYP2C19

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
CYP2C19*2	F	CAACCAgAgCTTggCATATT
	R	gTAAACACACAACAgTCAATg
CYP2C19*17	F	gAACAggATgAATgTggTA
	R	gTggCgAATTATCTCTTACA

2.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10 х буферный раствор D, 10 х буферный раствор S, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Приготовить реакционные смеси согласно таблицам 7,8 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционных смесей в расчёте на один образец – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.7 – Состав реакционной смеси для амплификации СУР2С19*2

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10х буферный раствор D	2,5 мкл	1х
MgCl ₂ (25 мМ)	2,0 мкл	2 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Тaq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

Таблица 2.8 – Состав реакционной смеси для амплификации СУР2С19*17

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10x буферный раствор S	2,5 мкл	1x
MgCl ₂ (25 мМ)	2,0 мкл	2 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Тақ ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

2. Реакционные смеси перемешать пипетированием.

3. В каждую ПЦР-пробирку объёмом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объёме 2 мкл.

4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл соответствующей реакционной смеси.

5. Промаркировать ПЦР-пробирки.

6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».

7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».

Таблица 2.9 – Программа амплификации фрагментов СУР2С19*2, СУР2С19*17

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	30 сек	40 циклов
54 °С	30 сек	
72 °С	45 сек	
72 °С	5 мин	1 цикл
10 °С	∞	хранение

8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой. Программу амплификации задать согласно таблице 2.9.

2.2 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов СУР2С19*2

10 х буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10 х буферный раствор при комнатной температуре.

1. Для проведения рестрикционного анализа ампликонов СУР2С19*2 эндонуклеазой рестрикции *SmaI* (в рестрикционном буферном растворе, идущем в комплекте) приготовить рестрикционную смесь согласно таблице 10 в объеме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объем рестрикционной смеси в расчёте на один компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от –18 °С до –20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.10 – Состав рестрикционной смеси для рестрикционного анализа СУР2С19*2

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10х буферный раствор	3 мкл	1х
<i>SmaI</i>	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестрикционной смеси.

3. Рестрикцию проводить при температуре 37 °С в течение 2 часов.

2.3 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов СУР2С19*17

10x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10x буфер при комнатной температуре.

1. Для проведения рестрикционного анализа ампликонов СУР2С19*17 эндонуклеазой рестрикции *SfaNI* (в рестрикционном буфере, идущем в комплекте) приготовить рестрикционную смесь согласно таблице 11 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объём рестрикционной смеси в расчёте на один компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.11 – Состав рестрикционной смеси для рестрикционного анализа СУР2С19*17

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10x буферный раствор	3 мкл	1x
SfaNI	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестрикционной смеси.

3. Рестрикцию проводить при температуре 37 °С в течение 2 часов.

2.4 Визуализация продуктов рестрикции и интерпретация результатов

Разделение продуктов рестрикционного анализа CYP2C19*2 проводить методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле.

Различные генотипы CYP2C19*2 характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: GG генотип – 212 и 113 п.н., GA генотип – 325, 212 и 113 п.н., AA генотип – 325 п.н.

Разделение продуктов рестрикционного анализа CYP2C19*17 проводить методом вертикального гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле.

Различные генотипы CYP2C19*17 характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: CC генотип – 129 и 20 п.н., CT генотип – 149, 129 и 20 п.н., TT генотип – 149 п.н.

3 Определение полиморфизма CYP2D6*4 гена CYP2D6

Применяется метод ПЦР-ПДРФ. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, использовать олигонуклеотидные праймеры (таблица 2.12).

Таблица 2.12 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК гена CYP2D6

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
CYP2D6*4	F	gTgATgggCAgAAgggCAC
	R	gCAAATCCTgCTCTTCCgA

3.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10x буфер D, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 13 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.13 – Состав реакционной смеси для амплификации СУР2D6*4

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10x буферный раствор D	2,5 мкл	1x
MgCl ₂ (25 мМ)	1,0 мкл	1 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Тaq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.

3. В каждую ПЦР-пробирку объёмом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объёме 2 мкл.

4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл реакционной смеси.

5. Промаркировать ПЦР-пробирки.
6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».
7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».
8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой. Программу амплификации задать согласно таблице 14.

Таблица 2.14 – Программа амплификации фрагментов СУР2D6*4

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	30 сек	36 циклов
62,6 °С	30 сек	
72 °С	40 сек	
72 °С	5 мин	1 цикл
10 °С	∞	хранение

3.2 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов СУР2D6*4

10 x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10 x буферный раствор при комнатной температуре.

1. Для проведения рестрикционного анализа ампликонов СУР2D6*4 эндонуклеазой рестрикции *BstNI* (в рестрикционном буферном растворе, идущем в комплекте) приготовить рестрикционную смесь согласно таблице 15 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объём рестрикционной смеси в расчёте на один компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.15 – Состав рестрикционной смеси для рестрикционного анализа CYP2D6*4

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор	3 мкл	1x
BstNI	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестрикционной смеси.

3. Рестриктию проводить при температуре 60 °С в течение 2 часов.

3.3 Визуализация продуктов рестрикции и интерпретация результатов

Разделение продуктов рестрикционного анализа CYP2D6*4 проводить методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле.

Различные генотипы CYP2D6*4 характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: GG генотип – 252 и 82 п.н., GA генотип – 334, 252 и 82 п.н., AA генотип – 334 п.н.

4 Определение полиморфизма CYP1A2*1F гена CYP1A2

Применяется метод ПЦР-ПДРФ. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, использовать олигонуклеотидные праймеры (таблица 2.16).

Таблица 2.16 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК гена CYP1A2

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
	CYP1A2*1F	F
R		CTgAgggTTgAgATggAgAC

4.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10 х буферный раствор S, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 17 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.17 – Состав реакционной смеси для амплификации СУР1А2*1F

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10х буферный раствор S	2,5 мкл	1х
MgCl ₂ (25 мМ)	1,5 мкл	1,5 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Тaq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.
3. В каждую ПЦР-пробирку объёмом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объёме 2 мкл.
4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл реакционной смеси.
5. Промаркировать ПЦР-пробирки.
6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».
7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».
8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой. Программу амплификации задать согласно таблице 2.18.

Таблица 2.18 – Программа амплификации фрагментов СУР1А2*1F

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	30 сек	36 циклов
62,4 °С	30 сек	
72 °С	40 сек	
72 °С	5 мин	1 цикл
10 °С	∞	хранение

4.2 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов СУР1А2*1F

10 x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10 x буферный раствор при комнатной температуре.

1. Для проведения рестриционного анализа ампликонов СУР1А2*1F эндонуклеазой рестрикции *ApaI* (в рестриционном буферном растворе, идущем в комплекте) приготовить рестриционную смесь согласно таблице 19 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объём рестриционной смеси в расчёте на один

компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.19 – Состав рестрикционной смеси для рестрикционного анализа CYP2D6*4

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор	3 мкл	1x
ApaI	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестрикционной смеси.

3. Рестрикцию проводить при температуре 37 °С в течение 2 часов.

4.3 Визуализация продуктов рестрикции и интерпретация результатов

Разделение продуктов рестрикционного анализа CYP1A2*1F проводить методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле.

Различные генотипы CYP1A2*1F характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: СС генотип – 340 и 127 п.н., СА генотип – 467, 340 и 127 п.н., АА генотип – 467 п.н.

5 Определение полиморфизма С3435Т гена MDR1

Применяется метод ПЦР-ПДРФ. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, использовать олигонуклеотидные праймеры (таблица 2.20).

Таблица 2.20 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК гена MDR1

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
С3435Т	F	gCTggTCCTgAAgTTgATCTgTgAAC
	R	AAATgTTgCTCTCTCCTAAACCTgAAg

5.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10x буферный раствор D, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 21 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец – 30 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.

3. В каждую ПЦР-пробирку объёмом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объёме 2 мкл.

4. В каждую ПЦР-пробирку внести 28 мкл реакционной смеси.

5. Промаркировать ПЦР-пробирки.

6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».

7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».

8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой. Программу амплификации задать согласно таблице 2.22.

Таблица 2.21 – Состав реакционной смеси для амплификации С3435Т

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор D	3,0 мкл	1x
MgCl ₂ (25 мМ)	2,4 мкл	2 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,4 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,4 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,4 мкл	0,4 мкМ
Тақ ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 30 мкл	-

Таблица 2.22 – Программа амплификации фрагментов С3435Т

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	30 сек	40 циклов
61 °С	30 сек	
72 °С	30 сек	
72 °С	5 мин	1 цикл
10 °С	∞	хранение

5.2 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов С3435Т гена MDR1

10 x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10 x буферный раствор при комнатной температуре.

1. Для проведения рестриционного анализа ампликонов MDR1 С3435Т эндонуклеазой рестрикции *MboI* (в рестриционном буфере,

идущем в комплекте) приготовить рестрикционную смесь согласно таблице 23 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объём рестрикционной смеси в расчёте на один компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.23 – Состав рестрикционной смеси для рестрикционного анализа С3435Т гена MDR1

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 х буферный раствор	3 мкл	1х
MboI	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

2. К продуктам амплификации (30 мкл) добавить 5 мкл рестрикционной смеси.

3. Рестриксию проводить при температуре 37 °С в течение 2 часов.

5.3 Визуализация продуктов рестрикции и интерпретация результатов

Разделение продуктов рестрикционного анализа С3435Т гена MDR1 проводить методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле.

Различные генотипы С3425Т характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: СС генотип – 236, 172, 73 и 15 п.н., СТ генотип – 408, 236, 172, 73 и 15 п.н., ТТ генотип – 408, 73 и 15 п.н.

6 Определение полиморфизма С-1019G гена HTR1A

Применяется метод ПЦР-ПДРФ. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, использовать олигонуклеотидные праймеры (таблица 2.24).

Таблица 2.24 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК гена HTR1A

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
HTR1A C-1019G	F	gTTCgTTTgTTTTTggAgAC
	R	gAAgAAgACCGAgTgTgTCATC

6.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10x буфер S, 25 mM MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 mM, олигонуклеотидные праймеры) хранить при температуре от минус 18 °C до минус 20 °C. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 25 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус 18 °C до минус 20 °C, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.

3. В каждую ПЦР-пробирку объёмом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объёме 2 мкл.

Таблица 2.25 – Состав реакционной смеси для амплификации гена HTR1A

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10x буферный раствор S	2,5 мкл	1x
MgCl ₂ (25 мМ)	1,5 мкл	1,5 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Taq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл реакционной смеси.
5. Промаркировать ПЦР-пробирки.
6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».
7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».
8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой. Программу амплификации задать согласно таблице 2.26.

Таблица 2.26 – Программа амплификации фрагментов HTR1A C-1019G

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	25 сек	35 циклов
58 °С	25 сек	
72 °С	40 сек	
72 °С	5 мин	1 цикл
10 °С	∞	хранение

6.2 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов HTR1A C-1019G

10 x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10 x буферный раствор при комнатной температуре.

1. Для проведения рестрикционного анализа ампликонов HTR1A C-1019G эндонуклеазой рестрикции *BtsCI* (в рестрикционном буферном растворе, идущем в комплекте) приготовить рестрикционную смесь согласно таблице 27 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объём рестрикционной смеси в расчёте на один компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.27 – Состав рестрикционной смеси для рестрикционного анализа HTR1A C-1019G

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор	3 мкл	1x
<i>BtsCI</i>	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестрикционной смеси.

3. Рестрикцию проводить при температуре 50 °С в течение 2 часов.

6.3 Визуализация продуктов рестрикции и интерпретация результатов

Разделение продуктов рестрикционного анализа HTR1A проводить методом вертикального гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле.

Различные генотипы HTR1A C-1019G характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: CC генотип – 108 п.н., GC генотип – 108, 92 и 16 п.н., GG генотип – 92 и 16 п.н.

7 Определение полиморфизма RS6265 гена BDNF

Применяется метод ПЦР-ПДРФ. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, использовать олигонуклеотидные праймеры, последовательности которых представлены в таблице 28.

Таблица 2.28 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК гена BDNF

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
BDNF rs6265	F	ACTgTCgAGAgCgTgAATgg
	R	AgAAgAggAggCTCCAAAagg

7.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10 x буферный раствор D, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 29 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно

храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.
3. В каждую ПЦР-пробирку объемом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объеме 2 мкл.
4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл реакционной смеси.
5. Промаркировать ПЦР-пробирки.
6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».
7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».

Таблица 2.29 – Состав реакционной смеси для амплификации гена BDNF

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор D	2,5 мкл	1x
MgCl ₂ (25 мМ)	1,5 мкл	1,5 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Тaq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

Таблица 2.30 – Программа амплификации фрагментов BDNF

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	25 сек	33 циклов
68 °С	30 сек	
72 °С	40 сек	
72 °С	5 мин	1 цикл
10 °С	∞	хранение

8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой. Программу амплификации задать согласно таблице 2.30.

7.2 Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов BDNF rs6265

10 x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить 10x буфер при комнатной температуре.

1. Для проведения рестриционного анализа ампликонов BDNF rs6265 эндонуклеазой рестрикции *BsaAI* (в рестриционном буферном растворе, идущем в комплекте) приготовить рестриционную смесь согласно таблице 31 в объеме, соответствующем числу анализируемых образцов. Общий объем рестриционной смеси в расчёте на один компонент – 5 мкл. Эндонуклеаза рестрикции должна постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить в последнюю очередь.

Таблица 2.31 – Состав рестриционной смеси для рестриционного анализа BDNF rs6265

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор	3 мкл	1x
BsaAI	5 ед.	5 ед. на реакцию
Вода сверхчистая	до 5 мкл	-

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестриционной смеси.

3. Рестрицию проводить при температуре 37 °С в течение 2,5 часов.

7.3 Визуализация продуктов рестрикции и интерпретация результатов

Разделение продуктов рестрикционного анализа гена BDNF проводить методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле.

Различные генотипы гена BDNF характеризуются наличием на электрофореграмме фрагментов следующих длин: GG генотип – 232 и 96 п.н., GA генотип – 328, 232 и 96 п.н., AA генотип – 328 п.н.

8 Определение полиморфизма RS1414334 гена HTR2C

Применяется метод ПЦР в режиме реального времени. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, и детекции результатов использовать олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, последовательности которых представлены в таблицах 2.32, 2.33.

Таблица 2.32 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации полиморфного участка гена HTR2C

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
rs1414334	F	AgAATCACCCCTTTCCTCAATgC
HTR2C	R	TCCAgAgTAATgTTAgCTCgCTTC

Таблица 2.33 – Последовательности флуоресцентно-меченых зондов для детекции полиморфного участка гена HTR2C

Флуоресцентный краситель	Последовательность зондов		Гаситель флуоресценции
ROX	wild	TgACTTTgCTACCCTCTCTTgCTgTC	BHQ-2
FAM	mut	TgACTTTgCTACCCTgTCTTgCTgTC	RTQ-1

8.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10 х буферный раствор S, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры, флуоресцентно-меченые зонды) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре. Флуоресцентно-меченые зонды защищать от воздействия света.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 34 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить его в последнюю очередь.

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.

3. В каждую ПЦР-пробирку объёмом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объёме 2 мкл.

4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл реакционной смеси.

5. Промаркировать ПЦР-пробирки.

6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».

7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».

8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с функцией детекции продуктов амплификации в режиме реального времени. Программу амплификации задать согласно таблице 2.35.

Таблица 2.34 – Состав реакционной смеси для амплификации полиморфного участка гена HTR2C

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор S	2,5 мкл	1x
MgCl ₂ (25 мМ)	2 мкл	2 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Зонд wild (10 мкМ)	0,5 мкл	0,2 мкМ
Зонд mut (10 мкМ)	0,5 мкл	0,2 мкМ
Тaq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

Таблица 2.35 – Программа амплификации полиморфного участка rs1414334 гена HTR2C

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	15 сек	46 циклов
68 °С	60 сек	
10 °С	∞	хранение

8.2 Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам (см. таблицу 36).

Таблица 2.36 – Соответствие каналов флуоресценции и генотипов исследуемых образцов rs1414334 гена HTR2C

Канал флуоресценции	Генотип
ROX	CC
FAM	GG
ROX и FAM	CG

Пример анализа образцов на определение полиморфизма rs1414334 гена HTR2C приведён на рисунке 2.1.

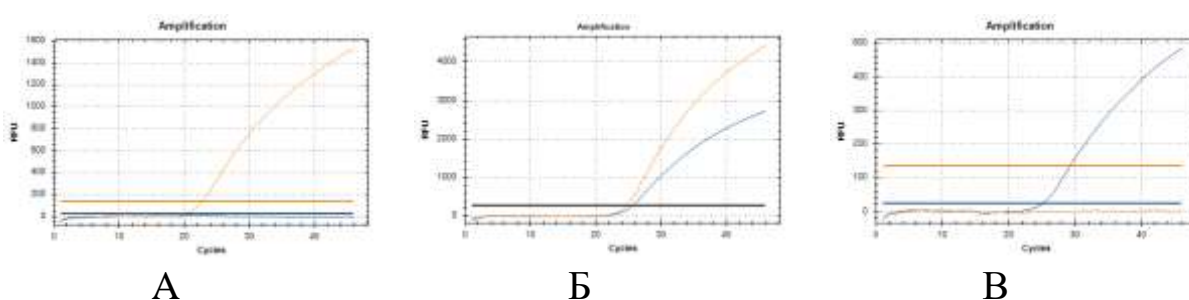


Рисунок 2.1 – кривые изменения флуоресценции во времени при амплификации полиморфного участка гена HTR2C (rs1414334)

А – Гомозигота дикого типа (генотип CC)

Б – Гетерозигота (генотип CG)

В – Гомозигота мутантного типа (генотип GG)

9 Определение полиморфизма RS6277 гена DRD2

Применяется метод ПЦР в режиме реального времени. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, и детекции результатов использовать олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, последовательности которых представлены в таблицах 2.37, 2.38.

Таблица 2.37 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации полиморфного участка гена DRD2

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
rs6277 DRD2	F	TCTTgggggTggTCTTTggC
	R	AgCTggAgATggAgATgCTCTC

Таблица 2.38 – Последовательности флуоресцентно-меченых зондов для детекции полиморфного участка гена DRD2

Флуоресцентный краситель	Последовательность зондов		Гаситель флуоресценции
ROX	wild	CgggggCTgTCgggAgTgCTg	BHQ-2
FAM	mut	CgggggCTgTCAggAgTgCTgTg	RTQ-1

9.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10 x буферный раствор S, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры, флуоресцентно-меченые зонды) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре. Флуоресцентно-меченые зонды защищать от воздействия света.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 39 в объеме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объем реакционной смеси в расчете на один образец – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус

18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить его в последнюю очередь.

Таблица 2.39 – Состав реакционной смеси для амплификации полиморфного участка гена DRD2

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 х буферный раствор S	2,5 мкл	1х
MgCl ₂ (25 мМ)	1,5 мкл	1,5 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Зонд wild (10 мкМ)	0,5 мкл	0,2 мкМ
Зонд mut (10 мкМ)	0,5 мкл	0,2 мкМ
Тaq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.
3. В каждую ПЦР-пробирку объемом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объеме 2 мкл.
4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл реакционной смеси.
5. Промаркировать ПЦР-пробирки.
6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».
7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».
8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с функцией детекции продуктов амплификации в режиме реального времени. Программу амплификации задать согласно таблице 2.40.

Таблица 2.40 – Программа амплификации полиморфного участка rs6277 гена DRD2

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	15 сек	45 циклов
65 °С	60 сек	
10 °С	∞	хранение

9.2 Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам (таблица 2.41).

Таблица 2.41 – Соответствие каналов флуоресценции и генотипов исследуемых образцов для полиморфизма rs6277 гена DRD2

Канал флуоресценции	Генотип
ROX	СС
FAM	ТТ
ROX и FAM	СТ

Пример анализа образцов на определение полиморфизма rs6277 гена DRD2 приведён на рисунке 2.2.

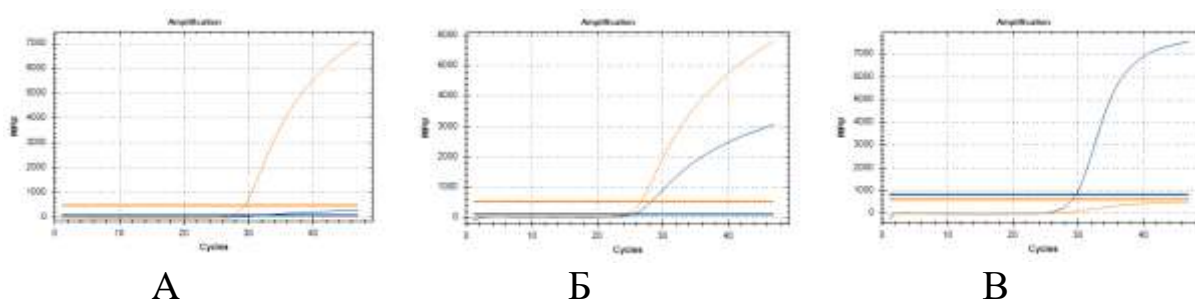


Рисунок 2.2 – кривые изменения флуоресценции во времени при амплификации полиморфного участка гена DRD2 (rs6277)

А – Гомозигота дикого типа (генотип СС)

Б – Гетерозигота (генотип СТ)

В – Гомозигота мутантного типа (генотип ТТ)

10 Определение полиморфизма RS1800497 гена ANKK1

Применяется метод ПЦР в режиме реального времени. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, и детекции результатов использовать олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, последовательности которых представлены в таблицах 2.42, 2.43.

Таблица 2.42 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации полиморфного участка гена ANKK1

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
rs1800497	F	TAgAACATCACgCAAATgTCCAC
ANKK1	R	AATTTCCATCTCggCTCCTg

Таблица 2.43 – Последовательности флуоресцентно-меченых зондов для детекции полиморфного участка гена ANKK1

Флуоресцентный краситель	Последовательность зондов		Гаситель флуоресценции
ROX	wild	TCAAAGTgCTggTCgAggCAgg	BHQ-2
FAM	mut	CTCAAAGTgCTggTCAAaggCAgg	RTQ-1

10.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10 x буферный раствор S, 25 mM MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 mM, олигонуклеотидные праймеры, флуоресцентно-меченые зонды) хранить при температуре от минус 18 °C до минус 20 °C. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре. Флуоресцентно-меченые зонды защищать от воздействия света.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 44 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить его в последнюю очередь.

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.

3. В каждую ПЦР-пробирку объёмом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объёме 2 мкл.

4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл реакционной смеси.

5. Промаркировать ПЦР-пробирки.

6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».

Таблица 2.44 – Состав реакционной смеси для амплификации полиморфного участка гена ANKK1

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор S	2,5 мкл	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 мкл	1,5 mM
Смесь дНТФ (2,5 mM)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Зонд wild (10 мкМ)	0,5 мкл	0,2 мкМ
Зонд mut (10 мкМ)	0,5 мкл	0,2 мкМ
Тaq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».

8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с функцией детекции продуктов амплификации в режиме реального времени. Программу амплификации задать согласно таблице 2.45.

Таблица 2.45 – Программа амплификации полиморфного участка rs1800497 гена ANKK1

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	15 сек	46 циклов
67 °С	60 сек	
10 °С	∞	хранение

10.2 Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам (таблица 2.46).

Таблица 2.46 – Соответствие каналов флуоресценции и генотипов исследуемых образцов для полиморфизма rs1800497 гена ANKK1

Канал флуоресценции	Генотип
ROX	GG
FAM	GA
ROX и FAM	AA

Пример анализа образцов на определение полиморфизма rs1800497 гена ANKK1 приведён на рисунке 2.3.

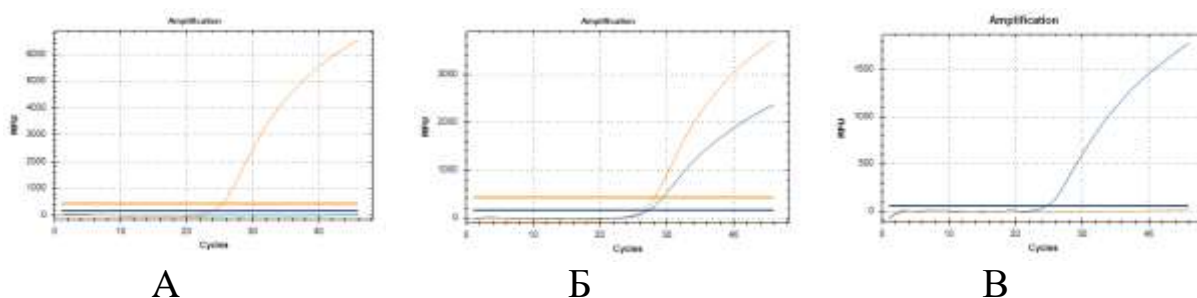


Рисунок 2.3 – кривые изменения флуоресценции во времени при амплификации полиморфного участка гена ANKK1 (rs1800497)

А – Гомозигота дикого типа (генотип GG)

Б – Гетерозигота (генотип GA)

В – Гомозигота мутантного типа (генотип AA)

11 Определение полиморфизма RS4680 ГЕНА COMT

Применяется метод ПЦР в режиме реального времени. Для амплификации участков ДНК, содержащих полиморфные позиции, и детекции результатов использовать олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, последовательности которых представлены в таблицах 2.47, 2.48.

Таблица 2.47 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации полиморфного участка гена COMT

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера	
rs4680 COMT	F	AggCTCATCACCATCgAgATC
	R	TgATAgTgggTTTTCAgTgAACg

Таблица 2.48 – Последовательности флуоресцентно-меченых зондов для детекции полиморфного участка гена COMT

Флуоресцентный краситель	Последовательность зондов		Гаситель флуоресценции
ROX	wild	TTCgCTggCgTgAAggACAagg	BHQ-2
FAM	mut	TTCgCTggCTTgAAggACAaggTg	RTQ-1

11.1 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реактивы для амплификации (10 x буферный раствор S, 25 мМ MgCl₂, смесь дНТФ 2,5 мМ, олигонуклеотидные праймеры, флуоресцентно-меченые зонды) хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С. Перед началом работы разморозить реактивы при комнатной температуре. Флуоресцентно-меченые зонды защищать от воздействия света.

Приготовление смеси проводить в ПЦР-боксе. Перед началом работы рабочую поверхность ПЦР-бокса обработать дезинфицирующим средством, включить ультрафиолетовый излучатель на 15 минут.

Таблица 2.49 – Состав реакционной смеси для амплификации полиморфного участка гена СОМТ

Компонент	Количество на одну реакцию	Конечная концентрация в реакционной смеси
10 x буферный раствор S	2,5 мкл	1x
MgCl ₂ (25 мМ)	3 мкл	3 мМ
Смесь дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	200 мкМ
Праймер F (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер R (20 мкМ)	0,5 мкл	0,4 мкМ
Зонд wild (10 мкМ)	0,5 мкл	0,2 мкМ
Зонд mut (10 мкМ)	0,5 мкл	0,2 мкМ
Тaq ДНК-полимераза	1 ед.	1 ед. на реакцию
ДНК	2 мкл (не менее 10 нг)	10 нг на реакцию
Вода сверхчистая	до 25 мкл	-

1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 49 в объёме, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объём реакционной смеси в расчёте на один образец – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 2 мкл. Компонент ДНК-полимераза должен постоянно храниться при температуре от минус

18 °С до минус 20 °С, при приготовлении смеси добавить его в последнюю очередь.

2. Реакционную смесь перемешать пипетированием.

3. В каждую ПЦР-пробирку объемом 0,2 мл добавить анализируемый образец ДНК в объеме 2 мкл.

4. В каждую ПЦР-пробирку внести 23 мкл реакционной смеси.

5. Промаркировать ПЦР-пробирки.

6. Содержимое ПЦР-пробирок перемешать с помощью шейкера типа «вортекс».

7. Осадить содержимое ПЦР-пробирок с помощью мини центрифуги типа «микроспин».

8. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор с функцией детекции продуктов амплификации в режиме реального времени. Программу амплификации задать согласно таблице 2.50.

Таблица 2.50 – Программа амплификации полиморфного участка rs4680 гена COMT

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1 цикл
95 °С	15 сек	46 циклов
68 °С	90 сек	
10 °С	∞	хранение

11.2 Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам (таблица 2.51).

Таблица 2.51 – Соответствие каналов флуоресценции и генотипов исследуемых образцов для полиморфизма rs4680 гена COMT

Канал флуоресценции	Генотип
ROX	GG
FAM	GA
ROX и FAM	AA

Пример анализа образцов на определение полиморфизма rs4680 гена COMT приведён на рисунке 2.4.

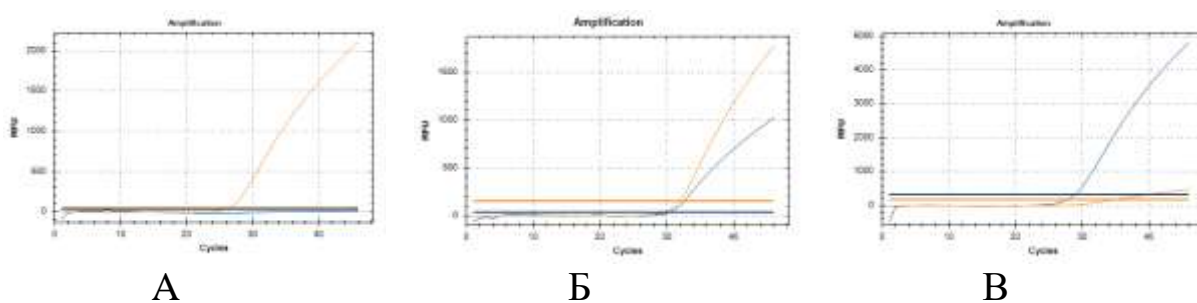


Рисунок 2.4 – кривые изменения флуоресценции во времени при амплификации полиморфного участка гена COMT (rs4680)

А – Гомозигота дикого типа (генотип GG)

Б – Гетерозигота (генотип GA)

В – Гомозигота мутантного типа (генотип AA)

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
к инструкции по применению

АЛГОРИТМ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА

