

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени для выявления интенсивности экспрессии гена *ABL* человека (ОНКОСКРИН 14-Q)

ВВЕДЕНИЕ

Ген *ABL* (*c-ABL*) расположен на 9 хромосоме, он является человеческим гомологом вирусного онкогена *v-ABL*, характерного для вируса мышинного лейкоза Абельсона. Ген кодирует белок, который представляет собой нерецепторную тирозинкиназу. Ген *ABL* относится к так называемым «генам домашнего хозяйства», функционирование которых необходимо для поддержания жизнедеятельности клеток, ген экспрессируется во всех типах клеток организма на сходном уровне.

Ген *ABL*, наряду с другими генами «домашнего хозяйства», такими как *BCR*, *GUSB* и β -2-микроглобулин, признан в качестве контрольного гена при определении уровня экспрессии химерных онкогенов, экспрессирующихся при острых и хронических лейкозах. Ген может служить в качестве контрольного при изучении экспрессии любых других генов человека, экспрессирующихся как при патологических состояниях, так и в норме. Определение уровня экспрессии гена *ABL* позволяет также оценить качество клинического материала и удостовериться в эффективном прохождении реакции обратной транскрипции.

2. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Набор реагентов ОНКОСКРИН 14-Q предназначен для выявления интенсивности экспрессии гена *ABL* человека методом ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan.
- 1.2. Набор предназначен только для применения *in vitro*.
- 1.3. Тест-система позволяет определять экспрессию *ABL* в образцах кДНК, полученных из образцов периферической крови, костного мозга и других тканей организма человека. Определение экспрессии *ABL* может применяться для вычисления относительной экспрессии патологически значимых генов в гематологии, онкологии и иммунологии, для оценки качества клинических образцов.
- 1.4. Набор ОНКОСКРИН 14-Q рассчитан на проведение 400 реакций ПЦР в реальном времени для анализа 100 клинических образцов в повторах, построения калибровочных кривых из 3 десятикратных разведений проб положительного контроля (14 серий по 2 повтора или 9 серий по 3 повтора), для постановки проб отрицательного контроля. Анализируемым материалом является комплементарная ДНК (кДНК).
- 1.5. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

2.1. Принцип действия.

- Количественное определение экспрессии гена *ABL* основано на трех последовательных операциях:
- выделение тотальной РНК из клинических образцов по методу Хомчинского (Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9).
 - проведение реакции обратной транскрипции с получением к-ДНК.

- проведение реакции амплификации в режиме реального времени, совмещенной с детекцией продуктов реакции.

Метод ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan основан на использовании специфического олигонуклеотидного зонда с флуоресцентным красителем и гасителем флуоресценции, а также термостабильной полимеразы, обладающей 5'-экзонуклеазной активностью. При проведении ПЦР-амплификации данная активность фермента разрушает олигонуклеотидный зонд, связанный с матрицей, высвобождая флуорофор. Уровень флуоресценции пропорционален количеству исходной матрицы. Число копий гена *ABL* в клинических образцах определяется по калибровочной кривой, которая строится по стандартам с известной концентрацией.

ПЦР в реальном времени для каждого образца проводится в 2-3 повторах. Помимо клинических образцов, в каждую реакцию включаются стандарты с известным числом копий исследуемого гена, отрицательный контроль реакции обратной транскрипции и отрицательный контроль ПЦР реакции.

Внимание! Реактивы для выделения тотальной РНК и получения кДНК в состав набора ОНКОСКРИН 14-Q не входят.

2.2. Состав набора.

В состав набора ОНКОСКРИН 14-Q входит 10 пробирок различного объема, содержащих готовые к применению реагенты:

Таблица 1

Название пробирки	Компонент	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Буфер 2х	Буфер для ПЦР 2х	Пластиковые пробирки вместимостью 2 мл с фиолетовой крышкой	3	1800
ДНК-полимераза	ДНК-полимераза	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с прозрачной крышкой	1	100
Деионизованная вода	Деионизованная вода	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с прозрачной крышкой	1	1500
Смесь праймеров <i>ABL</i> 10х	Смесь праймеров <i>ABL</i> 10х	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с зеленой крышкой	1	1100
Зонд <i>ABL</i> 10х	Зонд <i>ABL</i> 10х	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с красной крышкой	1	1100
10 ⁴ /5, 10 ⁵ /5, 10 ⁶ /5	Положительный контроль, десятикратные разведения: 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ копий гена в 5 мкл	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с синей крышкой	3	160

Пробирки с компонентами набора установлены в пластиковый или картонный штатив. Штатив с компонентами набора помещен в коробку из картона. Коробка с набором и инструкция по применению помещены в герметично закрывающийся прозрачный пакет из полипропилена.

2.3. Аналитические и диагностические характеристики.

Чувствительность:

– Воспроизводимая чувствительность - не более 10 копий гена *ABL* на реакцию, минимальная чувствительность составляет 1 копию гена *ABL* на реакцию.

– Чувствительность, определенная как количество тотальной РНК, выделенной из клинического образца, составляет не более 10 нг в пересчете на одну ПЦР реакцию.

Специфичность:

- Положительный контроль прохождения ПЦР в реальном времени - наличие специфического флуоресцентного сигнала в лунках (пробирках), соответствующих пробам положительного контроля после проведения ПЦР с добавлением контрольной кДНК, с эффективностью ПЦР реакции в пределах 1,05-0,95 (95-105%).
- Отрицательный контроль проведения ПЦР в реальном времени - отсутствие специфического флуоресцентного сигнала в лунках (пробирках), соответствующих пробам отрицательного контроля, после проведения ПЦР без добавления кДНК.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.

3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

3.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

3.4. Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

3.5. Работу с набором реагентов и анализируемыми клиническими образцами следует проводить в халатах и одноразовых медицинских перчатках без талька.

3.6. Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

3.7. Постановку ПЦР следует проводить в боксе. Всё лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

3.8. Работу с положительными контролями рекомендуется проводить в помещении, отдельном от места работы с остальным набором реактивов.

3.9. Все работы должны выполняться только с использованием одноразовых наконечников с фильтром для полуавтоматических пипеток. Пробирки и наконечники должны быть свободны от нуклеаз (маркировка «DNase/RNase free»).

3.10. В помещении, где проводится постановка ПЦР, поверхности рабочих столов и боксы обязательно должны облучаться ультрафиолетовым светом до начала и после окончания работ.

3.11. Лабораторная посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

3.12. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

4.1. Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором:

- ПЦР-бокс;
- ПЦР амплификатор в реальном времени, имеющий канал флуоресцентной детекции JOE/HEX (поглощение 515-545 нм, флуоресценция 560-585 нм) с присоединенным компьютером;
- микроцентрифуга/вортекс;
- пробирки пластиковые вместимостью 0,5 или 1,5 мл;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объёмом отбора жидкостей: 0,5-10 мкл, 5-50 мкл и 20-200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штативы для пробирок 0,5мл, 1,5 мл и 2,0 мл «рабочее место»;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 1-10 мкл; 1-100 мкл; 1-200 мкл;
- 96-луночные или 48-луночные планшеты из оптически прозрачного бесцветного пластика или пробирки пластиковые объемом 0,2 мл/стрипы из оптически прозрачного бесцветного пластика в зависимости от типа амплификатора;
- пленка полимерная оптически прозрачная для ПЦР плашек или крышки для стрипов в зависимости от типа амплификатора;
- холодильник фармацевтический типа Sanyo MPR-414F или бытовой с морозильной камерой, температура морозильной камеры не выше минус 18⁰С;
- перчатки медицинские.

4.2. Анализируемые образцы.

Анализируемым материалом является кДНК, полученная из тотальной РНК клинических образцов в реакции обратной транскрипции. При проведении ПЦР анализа рекомендуется использование 10-200 нг тотальной РНК в пересчете на одну ПЦР реакцию. Тотальная РНК может быть получена из периферической крови и костного мозга.

ПЦР в реальном времени для каждого образца проводится в 2-3 повторах. Помимо клинических образцов, в каждую реакцию включаются стандарты с известным числом копий исследуемого гена, отрицательный контроль реакции обратной транскрипции и отрицательный контроль ПЦР реакции.

Внимание! Реактивы для выделения тотальной РНК и получения кДНК в состав набора ОНКОСКРИН 14-Q не входят.

5. ПОРЯДОК РАБОТЫ

5.1. Проведение анализа.

5.1.1. Извлечь набор из холодильника, достать пробирки «Буфер 2х», «Деионизованная вода», «Смесь праймеров ABL 10х», «Зонд ABL 10х», контроль: 3 десятикратных разведения «10⁴/5», «10⁵/5», «10⁶/5», и установить их в штатив. Убрать оставшиеся компоненты набора в холодильник. Выдержать компоненты набора при комнатной температуре (от 18⁰С до 25⁰С) в течение 15-30 минут (с учётом полного размораживания). Все реагенты перед использованием тщательно перемешать, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18⁰С до 25⁰С) в течение 10 секунд при 1000 g.

5.1.2. Рассчитать, какое количество пробирок/стрипов/лунок необходимо для постановки реакции с учетом клинических образцов, трех образцов десятикратных разведений положительного контроля и отрицательного контроля (не содержащего кДНК-матрицы) в повторах для каждого образца. Приготовить и промаркировать соответствующие пробирки/стрипы/лунки с учетом способа детекции используемого амплификатора.

5.1.3. Извлечь набор из холодильника, достать пробирку «Полимераза» и установить её в штатив.

5.1.4. Компоненты набора «Буфер 2х», «Деионизованная вода», «Смесь праймеров ABL 10х», «Зонд ABL 10х», положительный контроль (десятикратные разведения) и «ДНК-полимераза» готовы к использованию.

5.1.5. Приготовить пробирку для ПЦР-смеси. Приготовить смесь для ПЦР в указанной ниже последовательности и количестве:

«Буфер 2х»	12,5 мкл х (N+1)
«Смесь праймеров ABL 10х»	2,5 мкл х (N+1)
«Зонд ABL 10х»	2,5 мкл х (N+1)
«Деионизованная вода»	2,3 мкл х (N+1)
«ДНК-полимераза»	0,2 мкл х (N+1)

Общий объём: 20 мкл х (N+1), где N - число реакций (пробирок, лунок).

5.1.6. Полученную по п. 5.1.5. рабочую смесь для ПЦР тщательно перемешать, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 10 секунд при 1000 g.

5.1.7. В пробирки/стрипы/лунки, приготовленные согласно п. 5.1.2., добавить по 20 мкл смеси для ПЦР. Добавить в соответствующие пробирки/лунки по 5 мкл анализируемой кДНК, контрольной ДНК (из пробирок положительного контроля: десятикратные разведения «10⁴/5», «10⁵/5», «10⁶/5»). В пробирки/лунки с отрицательным контролем добавить по 5 мкл деионизованной воды. Конечный реакционный объем каждого образца должен составить 25 мкл.

5.1.8. Закрыть пробирки/стрипы, в случае использования плашек заклеить их полимерной пленкой.

5.1.9. Поместить пробирки в ПЦР амплификатор и провести амплификацию в режиме реального времени (методом полимеразной цепной реакции) по следующей программе:

Т а б л и ц а 2

Температура	Время	Количество циклов	Регистрация флуоресценции
95 °C	10 мин	1	нет
95 °C	15 сек	50	нет
60 °C	60 сек		есть, канал R6G (Yellow)

Для более подробного описания процедуры проведения анализа необходимо использовать "Руководство по эксплуатации" для соответствующего ПЦР амплификатора.

5.2. Регистрация и учет результатов.

5.2.1. Для построения калибровочной кривой нужно использовать двукратные или трехкратные повторы разведений положительного контроля, концентрация которых составляет 10⁴, 10⁵ и 10⁶ копий в 5 мкл.

5.2.2. По окончании ПЦР-амплификации в режиме реального времени для каждой пробы определяется значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает линию порога (Threshold) (Рис.1).

5.2.3. По значениям стандартов (положительных контролей) с известной концентрацией строится калибровочная кривая, по которой, исходя из значения порогового цикла в каждой пробирке/лунке, определяется исходное число копий гена в каждом клиническом образце. Для более точного определения числа копий гена каждый клинический образец ставится в двух или трех повторах, для расчетов используется среднее значение числа копий. Построение калибровочной кривой и определение числа копий гена производится с помощью компьютерных программ, прилагаемых к ПЦР амплификатору.

5.2.4. При отсутствии флуоресцентного сигнала в образцах положительного контроля, а также при наличии флуоресцентного сигнала в образцах отрицательного контроля (не содержащих кДНК-матрицы) результаты реакции ПЦР в реальном времени признаются недействительными.

5.2.5. Значение коэффициента детерминации (R²) должно быть не ниже 0,98, а эффективность реакции в пределах 1,05-0,95 (95-105%).

5.2.6. Для ряда ПЦР амплификаторов в реальном времени (например ABIPrizm 7500, фирма «Applied Biosystems») предполагается дополнительное использование пассивного референсного

красителя при постановке ПЦР реакции. Референсный краситель в набор ОНКОСКРИН 14-Q не входит.

5.2.7. При расчете нужно учитывать следующее:

5.2.7.1. Линия порога устанавливается в начале линейной фазы флуоресценции. Для адекватного сравнения результатов, полученных в разных экспериментах, линия порога должна всегда иметь одинаковое значение и значения C_t для одинаковых стандартов не должны отличаться не более чем на 1 цикл.

5.2.7.2. Значение стандартного отклонения для порогового цикла для каждой анализируемой пробы не должно превышать 0,5 в повторях. В случае превышения данного значения стандартного отклонения результат реакции для анализируемого образца признается недействительным, и реакцию ПЦР для этого образца необходимо переставить. Допустимо исключение из расчета среднего числа копий гена значений для одного из трех повторов анализируемого образца, в случае, если значение C_t для него значительно отличается от значений C_t для двух других повторов и значения C_t для этих двух оставшихся повторов близки (стандартное отклонение не выше 0,5).

5.2.7.3. Низкое значение числа копий гена *ABL* в образце - менее 10^3 , свидетельствует о плохом качестве РНК или кДНК, необходимо повторное взятие клинического материала и/или перестановка реакции обратной транскрипции.

5.2.7.4. В случае, когда ген *ABL* используется в качестве контрольного гена для определения относительной экспрессии другого гена, желательно проводить определение экспрессии гена *ABL* и исследуемого гена для данного клинического образца в одной ПЦР реакции, поскольку различия в прохождении двух независимых ПЦР реакций могут внести ошибку в вычисление относительной экспрессии.

5.2.7.5. Для корректного проведения реакции ПЦР в реальном времени и вычисления экспрессии гена *ABL* в клинических образцах, необходимо использовать одинаковое количество тотальной РНК при проведении реакции обратной транскрипции для всех клинических образцов. Рекомендуемое количество тотальной РНК в пересчете на 1 реакцию ПЦР в реальном времени составляет 10-200 нг. Реактивы для выделения тотальной РНК и проведения реакции обратной транскрипции в набор «ОНКОСКРИН 14-Q» не входят.

5.2.6.7. Наличие флуоресцентного сигнала (детектируемое значение C_t) в пробах отрицательных контролей свидетельствует о контаминации. Необходимо переставить реакцию ПЦР в реальном времени или реакцию обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. При этом желательно взять ранее не использованные реактивы и предпринять меры к устранению контаминации.

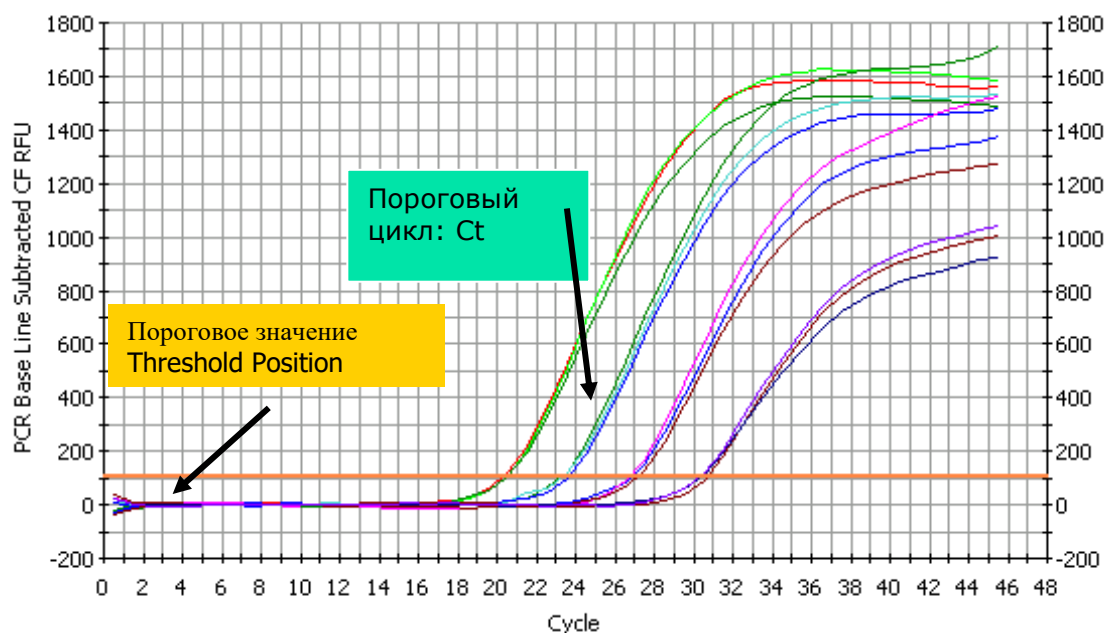


Рис.1 Параметры реакции ПЦР в реальном времени, учитываемые при расчете.

6. ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

- 6.1. Транспортирование диагностического набора следует производить всеми видами крытого транспорта при температуре минус 20°C не более 2-х суток.
- 6.2. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.
- 6.3. Срок годности набора - 12 месяцев со дня приемки набора отделом контроля качества предприятия-изготовителя.
- 6.4. Комплект реактивов для проведения ПЦР в реальном времени должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя, в морозильнике при температуре от минус 18°C до минус 22°C в течение всего срока эксплуатации тест-системы.
- 6.5. Компоненты набора рекомендуется замораживать/размораживать не более 3 раз. Исходя из этого, рекомендуется при первом использовании разделить реактивы на аликвоты, содержащие количество каждого компонента, необходимое для 2-3 реакций, и заморозить.
- 6.6. Положительные контроли желательно хранить при температуре минус 70°C, отдельно от остальных компонентов набора, повторно замораживать/размораживать не более 3 раз, размороженные аликвоты рекомендуется хранить при 4°C (максимальный срок 3 недели).
- 6.7. Пробирку «Зонд ABL 10х» нельзя длительное время подвергать действию прямого света.
- 6.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора ОНКОСКРИН 14-Q следует обращаться в ООО «ГеноТехнология» по адресу: 117485, Москва, ул. Профсоюзная, д. 104, тел. (499)530-01-95, (499)502-94-17, (499)530-02-58, e-mail: info@genetechnology.ru.