

ГенТест-М BRCA1, BRCA2

Набор реагентов для выявления наследственных мутаций *185delAG*, *2080delA*, *4153delA*, *5382insC*, *c.3700_3704delGTAAA*, *c.3756_3759delGTCT*, *T300G* в гене человека *BRCA1* и *6174delT* в гене человека *BRCA2* методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («ГенТест-М BRCA1, BRCA2»)

Кат. № R2007

Инструкция по применению

Сокращения и обозначения

Cq (Ct)	Пороговый цикл
FAM	Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
N	Нормальный аллель, генотип N
m	Мутантный аллель, генотип m
Номенклатура HGVS	Nomenclature – Human Genome Variation Society
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
Олиго-смесь М	Обобщенное название компонентов набора: «Олиго-смесь М BRCA1 185delAG», «Олиго-смесь М BRCA1 2080delA», «Олиго-смесь М BRCA1 4153delA», «Олиго-смесь М BRCA1 5382insC», «Олиго-смесь М BRCA1 с.3700 _ 3704delGTAAA», «Олиго-смесь М BRCA1 с.3756 _ 3759delGTCT», «Олиго-смесь М BRCA1 T300G», «Олиго-смесь М BRCA2 6174delT»
ПКО	Положительный контрольный образец, обобщенное название компонентов: ПКО 185delAG, ПКО 2080delA, ПКО 4153delA, ПКО 5382insC, ПКО с.3700 _ 3704delGTAAA, ПКО с.3756 _ 3759delGTCT, ПКО T300G, ПКО 6174delT
ОКО	Отрицательный контрольный образец, обобщенное название компонентов: ОКО 185delAG, ОКО 2080delA, ОКО 4153delA, ОКО 5382insC, ОКО с.3700 _ 3704delGTAAA, ОКО с.3756 _ 3759delGTCT, ОКО T300G, ОКО 6174delT
ОКВ	Отрицательный контроль выделения
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией накопления продукта амплификации ДНК в режиме реального времени
ТУ	Технические условия

Оглавление

Сокращения и обозначения.....	2
1. Название, варианты исполнения	4
2. Сведения, необходимые для эксплуатации	4
3. Назначение, область применения.....	4
4. Состав, форма выпуска	5
5. Количество анализируемых образцов, кратность применения.....	7
6. Принцип действия	7
7. Научная обоснованность анализа	7
8. Аналитические характеристики.....	8
9. Ограничения метода.....	9
10. Меры предосторожности.....	10
11. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки	12
12. Биологический материал	12
13. Протокол анализа образца	13
14. Анализ данных	17
15. Условия транспортирования, хранения и использования	21
16. Срок годности	21
17. Критерии непригодности набора реагентов для применения	21
18. Гарантии изготовителя	22
19. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость.....	22
20. Порядок подачи рекламаций.....	22
21. Утилизация	22
Приложение №1.....	23
Литература.....	26
Графические символы.....	27

1. Название, варианты исполнения

Набор реагентов для выявления наследственных мутаций *185delAG*, *2080delA*, *4153delA*, *5382insC*, *с.3700 _ 3704delGTAAА*, *с.3756 _ 3759delGTCT*, *T300G* в гене человека *BRCA1* и *6174delT* в гене человека *BRCA2* методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*»).

Набор реагентов «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*» выпускается в одном варианте исполнения.

2. Сведения, необходимые для эксплуатации

Внимательно изучите инструкцию перед применением набора реагентов. Все сведения, необходимые для применения (эксплуатации) набора реагентов «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*», приведены в настоящей инструкции. Другие документы по эксплуатации, кроме инструкции, не предусмотрены.

3. Назначение, область применения

Только для применения в научно-исследовательских целях.

Не для применения в медицине или ветеринарии.

Набор реагентов «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*» предназначен для качественного определения наследственных мутаций *185delAG*, *2080delA*, *4153delA*, *5382insC*, *с.3700 _ 3704delGTAAА*, *с.3756 _ 3759delGTCT*, *T300G* в гене человека *BRCA1* и *6174delT* в гене человека *BRCA2*.

Таблица 1 – определяемые мутации

Ген	Мутация	Номенклатура HGVS	Идент-р dbSNP	Фланкирующая последовательность
BRCA1	185delAG	NG_005905.2:g.93953_93954insAG NM_007294.3:c.66_67delAG NP_009225.1:p.Glu23Argfs	rs80357713	AATGCTATGCAGAAAA TCTT[AG]-JAGTGTCCC ATCTGGTAAGTC
	2080delA	NG_005905.2:g.124414delA NM_007294.3:c.1961delA NP_009225.1:p.Lys654Serfs	rs80357522	TGAAGAGATAAGAAAA AAA[А]-JGTACAACCAAAA TGCCAGTCA
	4153delA	NG_005905.2:g.126488delA NM_007294.3:c.4035delA NP_009225.1:p.Glu1346Lysfs	rs80357711	GAATTGGTTTCAGATGAT GA[А]-JGAAAGAGGAAC GGGCTTGGGA
	5382insC	NG_005905.2:g.160921dup NM_007294.3:c.5266dup NP_009225.1:p.Gln1756Profs	rs397507247	AAAGCGAGCAAGAGAAT CC[C]-CJAGGACAGAAA GGTAAAGCTC
	с.3700 _ 3704delGTAAА	NG_005905.2:g.126148_126152GTAAА NM_007300.3:c.3700_3704delGTAAА NP_009225.1:p.Val1234Glnfs	rs80357609	AACACTTGTATTTTGGT AAA[Г]-JGATAAA/-JCAATAT ACCTTCTCAGTCTA
	с.3756 _ 3759delGTCT	NG_005905.2:g.126205_126208GTCT NM_007300.3:c.3756_3759delGTCT NP_009231.2:p.Ser1253Argfs	rs80357868	TAGGCATAGCACCGTTGCT ACCGAGTGTCT[GTCT]-JAA GAACACAGAGGAGAATTT
BRCA2	T300G	NG_005905.2:g.111497T>G NM_007294.3:c.181T>G NP_009225.1:p.Cys61Gly	rs28897672	GAAGAAAGGGCCTTC ACAG[Т]-GJGTCCTTT ATGTAAGAATGAT
	6174delT	NG_012772.3:g.29822delT NM_000059.3:c.5946delT NP_000050.2:p.Ser1982Argfs	rs80359550	GGGATTTTTAGCACAG CAAG[Т]-JGGAATAATC TGTCAGGTATC

4. Состав, форма выпуска

Исключен непосредственный или опосредованный контакт с пользователем (телом человека) при соблюдении требований инструкции по применению.

Таблица 2 – состав и форма выпуска

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПЦР-смесь М	4.8 мл	8 пробирок по 0.6 мл	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит Taq-полимеразу, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg^{2+} и реакционный буфер.
Олиго-смесь М BRCA1 185delAG	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357713 (<i>185 delAG</i>).
Олиго-смесь М BRCA1 2080delA	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357522 (<i>2080delA</i>).
Олиго-смесь М BRCA1 4153delA	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357711 (<i>4153delA</i>).
Олиго-смесь М BRCA1 5382insC	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs397507247 (<i>5382insC</i>).
Олиго-смесь М BRCA1 с.3700_3704 delGTAAA	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357609 (с.3700_3704 delGTAAA).

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
Олиго-смесь M BRCA1 с.3756_3759 delGTCT	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая	Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357868 (с.3756_3759delGTCT).
Олиго-смесь M BRCA1 T300G	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs28897672 (T300G).
Олиго-смесь M BRCA2 6174delT	0.55 мл	1 пробирка		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA2</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80359550 (6174delT).
ОКО 185delAG	0.13 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная зеленого цвета умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Каждый ОКО содержит индивидуальную смесь синтетических матриц ДНК, содержащих последовательности генотипов «N». Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипов «N».
ОКО 2080delA	0.13 мл	1 пробирка		
ОКО 4153delA	0.13 мл	1 пробирка		
ОКО 5382insC	0.13 мл	1 пробирка		
ОКО с.3700_3704 delGTAAA	0.13 мл	1 пробирка		
ОКО с.3756_3759 delGTCT	0.13 мл	1 пробирка		
ОКО T300G	0.13 мл	1 пробирка		
ОКО 6174delT	0.13 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Каждый ПКО содержит индивидуальную смесь синтетических матриц ДНК, содержащих последовательности генотипов «m». Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипов «m».
ПКО 185delAG	0.13 мл	1 пробирка		
ПКО 2080delA	0.13 мл	1 пробирка		
ПКО 4153delA	0.13 мл	1 пробирка		
ПКО 5382insC	0.13 мл	1 пробирка		
ПКО с.3700_3704 delGTAAA	0.13 мл	1 пробирка		
ПКО с.3756_3759delGTCT	0.13 мл	1 пробирка		
ПКО T300G	0.13 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бесцветная.	Контрольный образец без ДНК для подтверждения отсутствия контаминации. Для приготовления реакционных смесей
ПКО 6174delT	0.13 мл	1 пробирка		
Вода деионизированная	12 мл	8 пробирок по 1.5 мл	Жидкость прозрачная бесцветная.	

5. Количество анализируемых образцов, кратность применения

Набор рассчитан на 100 реакций. Набор реагентов позволяет проанализировать от 10 до 45 образцов, каждый в двух повторностях. Количество образцов определяется форматом постановки и степенью загрузки 96-луночного амплификатора ПЦР-РВ. Максимальное количество анализируемых образцов достигается при анализе всех образцов одновременно по одному полиморфизму и при полной загрузке 96-луночного амплификатора. Набор реагентов рассчитан на однократное, в том числе дробное, применение.

6. Принцип действия

Принцип метода (принцип действия) основан на полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени.

Полимеразная цепная реакция включает в себя две стадии. На первой стадии анализа ДНК происходит амплификация целевого фрагмента ДНК с участием специфических праймеров, образуется ампликон («ПЦР-смесь М»; «Олиго-смесь М»). Амплификация проходит вне зависимости от аллельного варианта. На второй стадии анализа ДНК происходит определение генотипа путем температурного плавления дуплекса: детектирующий зонд – ампликон («ПЦР-смесь М»; «Олиго-смесь М»). Температура плавления дуплекса, образованного зондом и «аллелем N» отличается от температуры плавления дуплекса, образованного зондом и «аллелем m». ДНК, содержащая оба аллеля, имеет две температуры плавления.

Для контроля качества результатов используются реакции контрольного образца без ДНК и реакции с ОКО и ПКО.

7. Научная обоснованность анализа

Мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2* ассоциированы с риском развития рака молочной железы, яичников, поджелудочной железы, желудка, предстательной железы, а также определяют чувствительность к препаратам платины, кросс-линкерам и ингибиторам PARP.

На настоящий момент выявлено более 1800 вариантов изменений в гене *BRCA1* и более 2000 в гене *BRCA2* [1]. При этом частота мутаций может различаться в зависимости от популяции и этнической принадлежности [2]. Для российской популяции описан спектр из 8 наиболее характерных мутаций [3,4] (Таблица 3).

Таблица 3 – мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*

Ген	Мутация	Частота встречаемости
<i>BRCA1</i>	<i>185delAG</i>	3,2%
	<i>2080delA</i>	11,1%
	<i>4153delA</i>	11,1%
	<i>5382insC</i>	55,6%
	<i>T300G</i>	12,7%
	<i>c.3700_3704delGTAAA</i>	1,6%
	<i>c.3756_3759delGTCT</i>	<1,6%
<i>BRCA2</i>	<i>6174delT</i>	4,8%

8. Аналитические характеристики

Наименование показателя	Характеристика и норма
Предел обнаружения	1.0 нг/мкл
Аналитическая специфичность (под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов «ГенТест-М <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> » специфически определять генотипы N и m мутаций <i>185delAG</i> , <i>2080delA</i> , <i>4153delA</i> , <i>5382insC</i> , <i>c.3700_3704delGTAAA</i> , <i>c.3756_3759delGTCT</i> , <i>T300G</i> в гене человека <i>BRCA1</i> , и <i>6174delT</i> в гене человека <i>BRCA2</i> на фоне всего остального генома человека, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах*)	Детекция генотипов «m»** в реакциях с ПКО Детекция генотипов «N»** в реакциях с ОКО Генотип не определяется в образцах ОКВ и контрольном образце без ДНК

* Для подтверждения специфичности используются: 1) образцы предприятия ПКО: ПКО *185delAG*, ПКО *2080delA*, ПКО *4153delA*, ПКО *5382insC*, ПКО *c.3700_3704delGTAAA*, ПКО *c.3756_3759delGTCT*, ПКО *T300G*, ПКО *6174delT*, ОКО: ОКО *185delAG*, ОКО *2080delA*, ОКО *4153delA*, ОКО *5382insC*, ОКО *c.3700_3704delGTAAA*, ОКО *c.3756_3759delGTCT*, ОКО *T300G*, ОКО *6174delT*, верифицированные по Сэнгеру; 2) ОКВ и контрольный образец без ДНК, который представляет собой деионизированную воду, свободную от ДНК.

** Генотипы m: *185delAG*, *2080delA*, *4153delA*, *5382insC*, *c.3700_3704delGTAAA*, *c.3756_3759delGTCT*, *300TT*, *6174delT*.

Генотипы N: *185AG*, *2080A*, *4153A*, *5382-*, *c.3700_3704GTAAA*, *c.3756_3759GTCT*, *300GG*, *6174T*.

9. Ограничения метода

9.1 Информация об интерферирующих веществах

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов была проведена оценка влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале.

Для проведения испытаний использовалась ДНК, выделенная из контрольных образцов предприятия (далее КОП), не содержащих потенциально интерферирующие вещества из Таблицы 4.

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале, каждое вещество из Таблицы 4 испытывалось в максимальной концентрации, которая, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов, а также в концентрации, превышающей нормальное содержание этих веществ в биоматериале, с целью установления концентрации, влияющей на результат работы набора реагентов.

Результаты приведены в Таблице 4. Каждое вещество в заданной концентрации добавлялось к КОП на этапе выделения ДНК (использовался набор реагентов «ЭкстрактДНК-1», кат.№ R1002, производства ООО «НОМОТЕК»). Выделенная ДНК была генотипирована испытуемым набором реагентов. По результатам сравнения генотипов образцов с и без добавления потенциально интерферирующих веществ, делался вывод о влиянии потенциально интерферирующих веществ на набор реагентов.

Потенциально интерферирующие вещества в концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияют на его специфичность. Влияние потенциально интерферирующих веществ на результат работы набора реагентов установлено только при увеличении концентрации веществ до концентраций, превышающих их известную максимальную концентрацию в биоматериале.

Таблица 4 – концентрации потенциально интерферирующих веществ

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация потенциально интерферирующих веществ, встречающаяся в биоматериале при нормальном использовании набора реагентов	Установленные концентрации потенциально интерферирующих веществ, влияющие на результат работы набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2»
Гемоглобин	220 г/л	400 г/л
Лактоферрин	200 мкг/мл	300 мкг/мл
IgG	17 г/л	60 г/л
Билирубин общий	160 мкмоль/л	500 мкмоль/л
Холестерин общий	12 ммоль/л	40 ммоль/л
Общие триглицериды	11,3 ммоль/л	50 ммоль/л

9.2 Совместимость с приборами

Набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» совместим с приборами:

1. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнение: C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (Производитель: Био-Рад Лабораториз, Инк, США);
2. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями, исполнение: StepOnePlus (Производитель: Лайф Текнолоджис Корпорейшн, США);
3. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500 (Производитель: Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд, Сингапур).

10. Меры предосторожности

10.1 Общие

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению, только в научно-исследовательских целях.
- Набор реагентов не содержит факторы инфекционной и микробной опасности.
- Набор содержит факторы токсикологической опасности, требующие обеспечение специальных мер безопасности. Компоненты с такими веществами имеют предупредительную маркировку:



10.2 Для оператора

- При проведении исследования необходимо строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в лабораториях при манипуляциях с биологическим материалом человека, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей.
- При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.
- Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к используемым электрическим приборам; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Для предотвращения контаминации этапы подготовки к амплификации (ПЦР) и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими необходимыми принадлежностями. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Примечание: Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории описаны в Приложении №1 данной инструкции по применению.

При работе с Набором реагентов соблюдать следующие правила:

- Использовать одноразовые нитриловые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.
- Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует утилизировать согласно правилам, принятым в организации.
- Набор реагентов готов к применению согласно инструкции по применению. Применять набор реагентов строго по назначению.
- Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации
- К работе с набором реагентов допускается только обученный персонал.
- Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать Набор реагентов по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

11. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки

Каждая зона ПЦР-лаборатории должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами (см. Приложение №1).

Замена амплификатора и пробирок для амплификации на оборудование и материалы с аналогичными характеристиками не допускается!

Перечень материалов и оборудования, необходимых для проведения исследования:

- ПЦР-бокс для приготовления реакционной смеси;
- ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР;
- Комплект дозаторов переменного объема и наконечников с фильтром, позволяющих отбирать объемы жидкостей от 2 до 1000 мкл;
- Амплификатор детектирующий:
 - Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнение: C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (Производитель: Био-Рад Лабораториз, Инк, США);
 - Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями, исполнение: StepOnePlus (Производитель: Лайф Текнолоджис Корпорейшн, США);
 - Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500 (Производитель: Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд, Сингапур).
- Пробирки для амплификации 0.1 мл (Кат. № SSI-3248-00, Производитель: SSI, США – для прибора StepOnePlus) или 0.2 мл (Кат. № SSI-3247-00, Производитель: SSI, США – для приборов CFX96 и 7500);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и 2.0 мл;
- Мини-центрифуга/вортекс;
- Термостат.

12. Биологический материал

ДНК, выделенная из периферической крови, буккального эпителия, слюны набором ExtractDNA Blood & Cells (кат. ## BC111T/M, Евроген) или его аналогами.

Для анализа одного образца по одной мутации необходимо 10 мкл препарата ДНК. Не проводить определение генотипа по смеси ДНК, выделенной из разных образцов.

13. Протокол анализа образца

13.1 Подготовка компонентов. Приготовление реакционных смесей

1. В ПЦР-боксе для приготовления реакционных смесей разморозить при температуре от +15 до +30 °С компоненты: «ПЦР-смесь М», «Вода деионизированная» и «Олиго-смесь М» (одновременно все восемь или только некоторые из них в зависимости от анализируемых мутаций).

2. Содержимое пробирок тщательно перемешать четырехкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортексе в течение 10 с, не допуская образования пены; сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

3. Рассчитать необходимый объем компонентов для реакционной смеси, исходя из числа исследуемых образцов и согласно Таблице 5.

Дополнительно необходимо провести реакции с:

- ОКО, ПКО;
- Контрольным образцом без ДНК.

Если при выделении ДНК были получены образцы ОКВ, то при постановке ПЦР включить их вместе с исследуемыми образцами, выделенными одновременно с ними.

Каждую реакцию с контрольными и исследуемыми образцами необходимо выполнить в двух повторностях.

Таблица 5 – расчет количества компонентов (контрольные образцы и выполнение всех образцов в двух повторностях учтены в формуле)

Для каждой мутации готовится реакционная смесь, в состав которой входит только одна из восьми олиго-смесей М.

Компонент реакционной смеси	Количество компонента, мкл (где N – анализируемые образцы, X – ОКВ, З – ОКО, ПКО и КО без ДНК)
Вода деионизированная	$10.5 \times 2(N+X+3)$
ПЦР-смесь М	$5.25 \times 2(N+X+3)$
Олиго-смесь М	$5.25 \times 2(N+X+3)$

4. Приготовить реакционную смесь.

Менять наконечники между компонентами!

5. Тщательно перемешать реакционную смесь встряхиванием на вортексе в течение 10 с; сбросить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 5 с.

6. Подготовить пробирки для ПЦР (стрипы; 1 стрип – 8 пробирок): установить в штатив, промаркировать.

Не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. Маркировку наносить на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.

Перед внесением образцов в пробирки для ПЦР (п. 7-13) ознакомиться со схемой расположения исследуемых образцов, ОКВ, ПКВ, ОКВ и Контрольного образца без ДНК относительно друг друга.

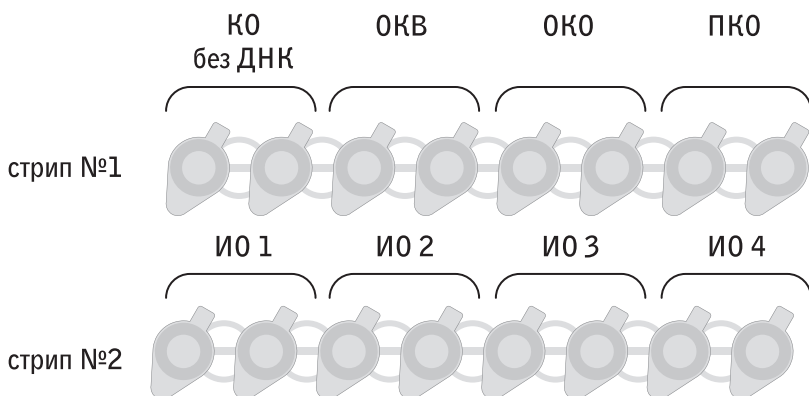


Рисунок 1 – схема расположения пробирок для ПЦР при исследовании 4 образцов. При изменении количества исследуемых образцов сохранять расположение пробирок для ПЦР и порядок внесения (п. 7-13) исследуемых образцов, ПКВ, ОКВ, ОКВ и Контрольного образца без ДНК относительно друг друга. ИО – исследуемый образец, ОКВ – отрицательный контроль выделения, КО без ДНК – контрольный образец без ДНК.

7. Внести по 20 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.

Менять наконечники между разными реакционными смесями!

8. Добавить по 5 мкл «Вода деионизированная», которая использовалась для приготовления реакционной смеси, в пробирки для ПЦР, соответствующие «Контрольному образцу без ДНК». Плотнo закрыть крышки пробирок.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

9. Закрыть крышки других пробирок для ПЦР. Перенести все пробирки для ПЦР в ПЦР-бокс для внесения ДНК.

13.2 Подготовка контрольных образцов и ДНК.

Внесение образцов в пробирки для ПЦР

10. В ПЦР-боксе для внесения ДНК разморозить при температуре от +15 до +30 °С контрольные образцы ОКО и ПКО.

Для каждой анализируемой мутации подготовить соответствующие ПКО и ОКО:

Анализируемая мутация	ОКО	ПКО
BRCA1 185delAG	ОКО 185delAG	ПКО 185delAG
BRCA1 2080delA	ОКО 2080delA	ПКО 2080delA
BRCA1 4153delA	ОКО 4153delA	ПКО 4153delA
BRCA1 5382insC	ОКО 5382insC	ПКО 5382insC
BRCA1 с.3700_3704 delGTAAA	ОКО с.3700_3704 delGTAAA	ПКО с.3700_3704 delGTAAA
BRCA1 с.3756_3759 delGTCT	ОКО с.3756_3759 delGTCT	ПКО с.3756_3759 delGTCT
BRCA1 T300G	ОКО T300G	ПКО T300G
BRCA2 6174delT	ОКО 6174delT	ПКО 6174delT

Разморозить/прогреть при температуре +50 °С исследуемые образцы ДНК и ОКВ.

Все образцы перемешать встряхиванием на вортексе, сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

11. Добавить по 5 мкл ОКВ в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

12. Добавить по 5 мкл ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

13. Добавить по 5 мкл контрольных образцов ОКО и ПКО в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения контрольного образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

14. Проверить плотность закрытия крышек пробирок.

15. Перемешать встряхиванием содержимое пробирок для ПЦР, не допуская образования пены.

16. Сбросить капли центрифугированием в течение 10 с.

Проведение ПЦР

17. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

18. Запустить программное обеспечение амплификатора. Открыть созданный ранее шаблон или ввести параметры:

- программа амплификации (одинакова для каждого прибора)

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация	95	3 мин	—
Амплификация 10 циклов	95	10 с	—
	62	30 с	—
Амплификация 40 циклов	95	10 с	—
	62	30 с	√
Формирование дуплекса	95	3 мин	—
	20	2 мин	—
Плавление дуплекса	От 20 до 70 °C с увеличением температуры на 0.5 °C каждые 10 с		√

Если при запуске программы амплификации на приборе 7500 появляется сообщение об ошибке «Hold Duration Too Short for Read», увеличьте время считывания сигнала на этапе плавления дуплекса до 30 с (такая ошибка возможна при использовании более ранней версии ПО, чем «7500 Software v2.3»).

- создать разметку плашки в соответствии с установленными пробирками в блок амплификатора:

- Для всех образцов, включая контрольные, выбрать канал детекции FAM;

Внимание!

Не использовать гаситель и пассивный референсный краситель!

- В поле "Target" ввести название исследуемой мутации,
- В поле "Sample Name" ввести названия исследуемых и контрольных образцов. Не вводить одинаковые названия для разных образцов;
- запустить программу амплификации.

14. Анализ данных

1. Настройки: Задать параметр «Пороговый уровень» (Threshold): для прибора CFX96 ввести значение 50, для прибора StepOne Plus ввести значение 2500, для прибора 7500 ввести значение 5000.*

2. Контроль качества ПЦР:

2.1 Анализ Контрольного образца без ДНК и ОКВ

$Cq \geq 38$ или Cq не определяется
и
График сигнала флуоресценции
не имеет S-образной формы

— НЕТ —>

Результаты эксперимента признаются
недействительными

— ДА —>

2.2 Анализ контрольных образцов ОКВ и ПКВ

Для образцов ОКВ и ПКВ $Cq \leq 26$

— НЕТ —>

Результаты эксперимента признаются
недействительными

— ДА —>

Для образцов ОКВ и ПКВ форма пиков и
их температуры плавления соответствуют
значениям, заявленным в Таблице 6

— НЕТ —>

Результаты эксперимента признаются
недействительными

3. Анализ исследуемых образцов:

Определение генотипов исследуемых образцов

Значение $Cq \leq 30^{**}$

— НЕТ —>

Образец анализировать нельзя

— ДА —>

Форма пиков и их температуры
плавления совпадают с ОКВ

— ДА —>

Генотип «N».
Для интерпретации генотипа см. Таблицу 7

— НЕТ —>

Форма пиков и их температуры
плавления совпадают с ПКВ

— ДА —>

Генотип «m».
Для интерпретации генотипа см. Таблицу 7

— НЕТ —>

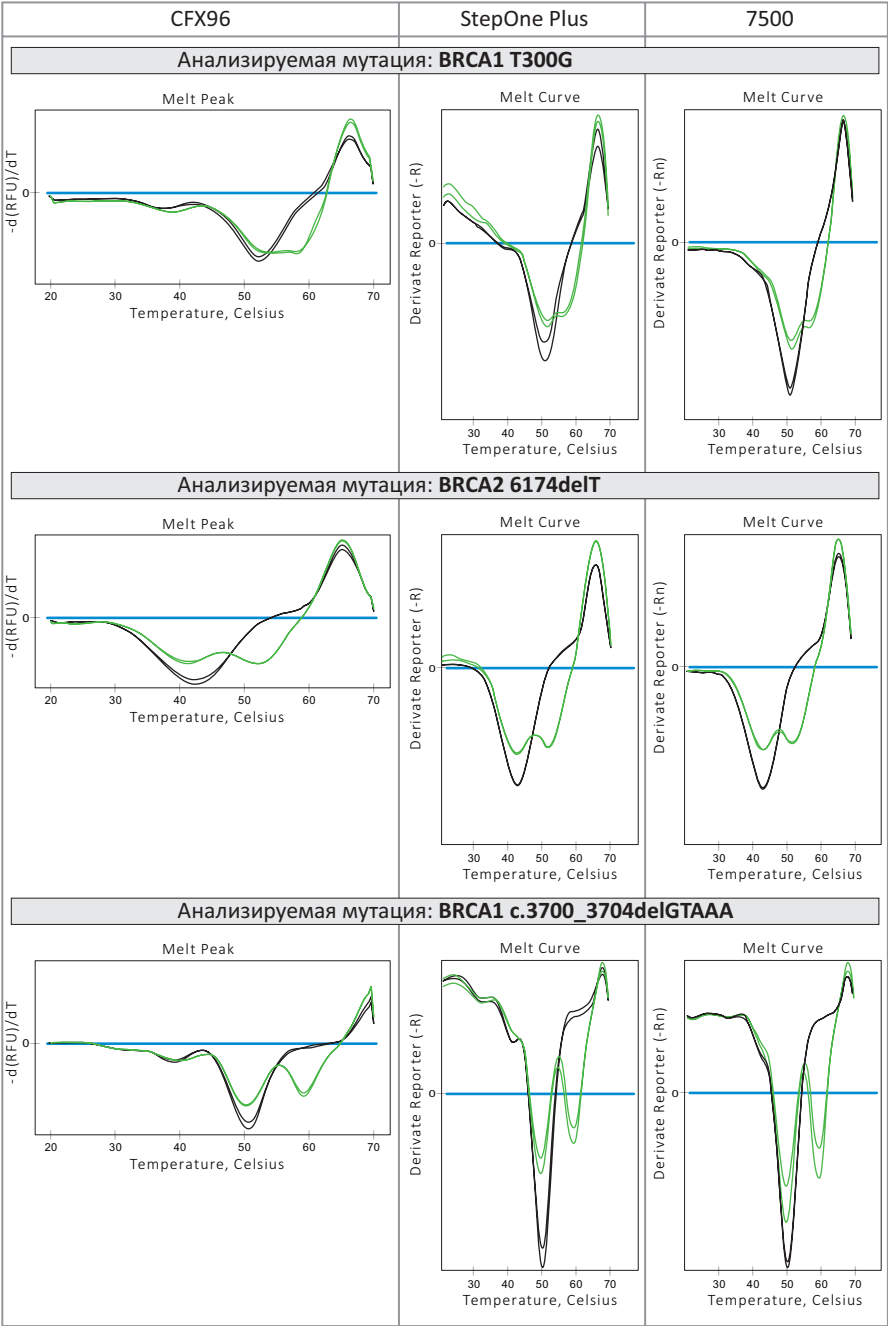
— НЕТ —>

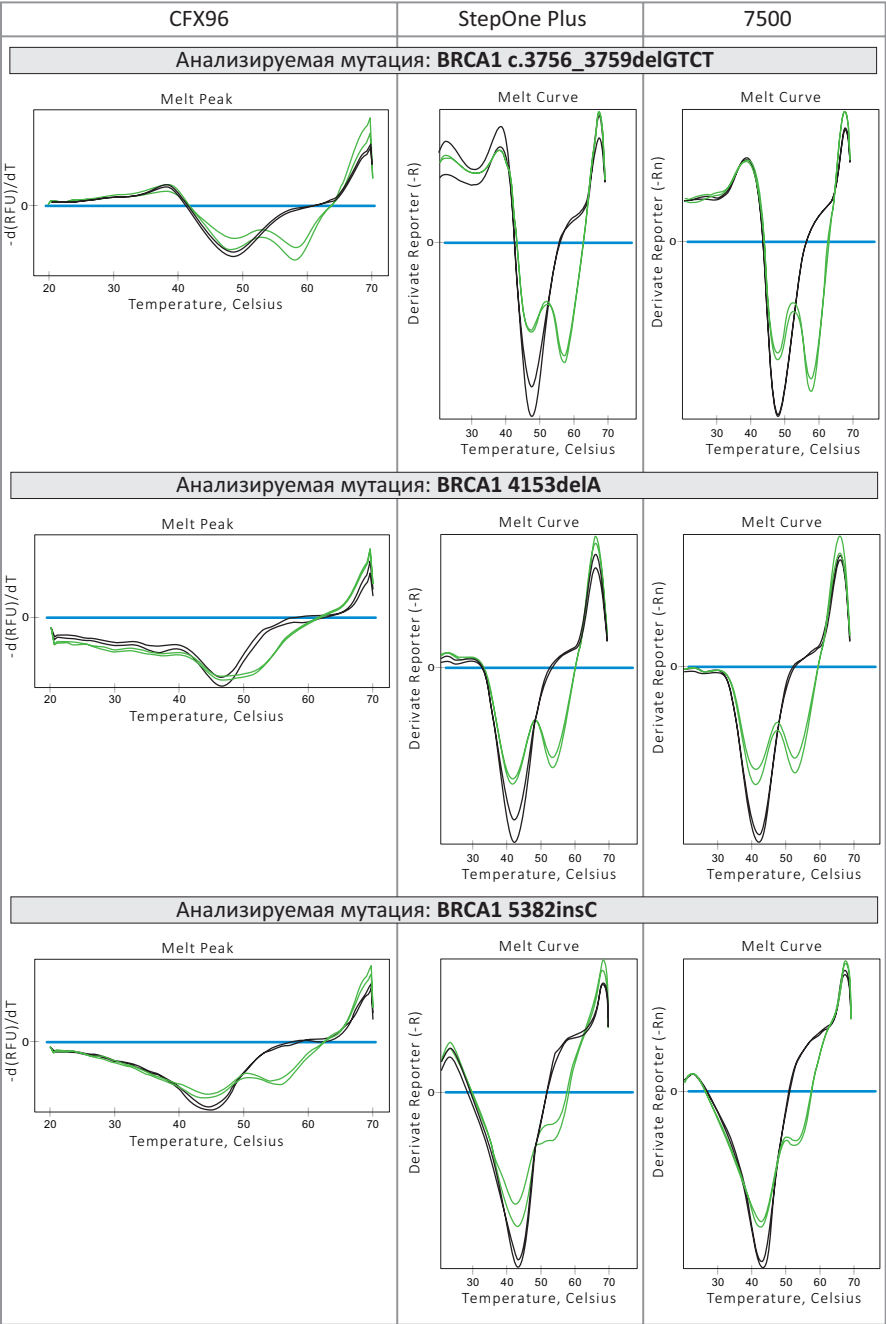
Образец анализировать нельзя

* при необходимости изменить значения Baseline так, чтобы часть графика флуоресценции до начала экспоненциального роста сигнала стала параллельна оси абсцисс и близка к нулю по оси ординат.

** если не выполняется условие $Cq \leq 30$, значит в исследуемом образце концентрация ДНК меньше, чем предел обнаружения (1 нг/мкл) набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» и образец анализировать нельзя.

Таблица 6 – Форма пиков ОКО и ПКО и их температуры плавления (Целевые пики ОКО и ПКО находятся в диапазоне от 40 до 65 °С ниже оси абсцисс; графики ОКО выделены черным, графики ПКО - зеленым).





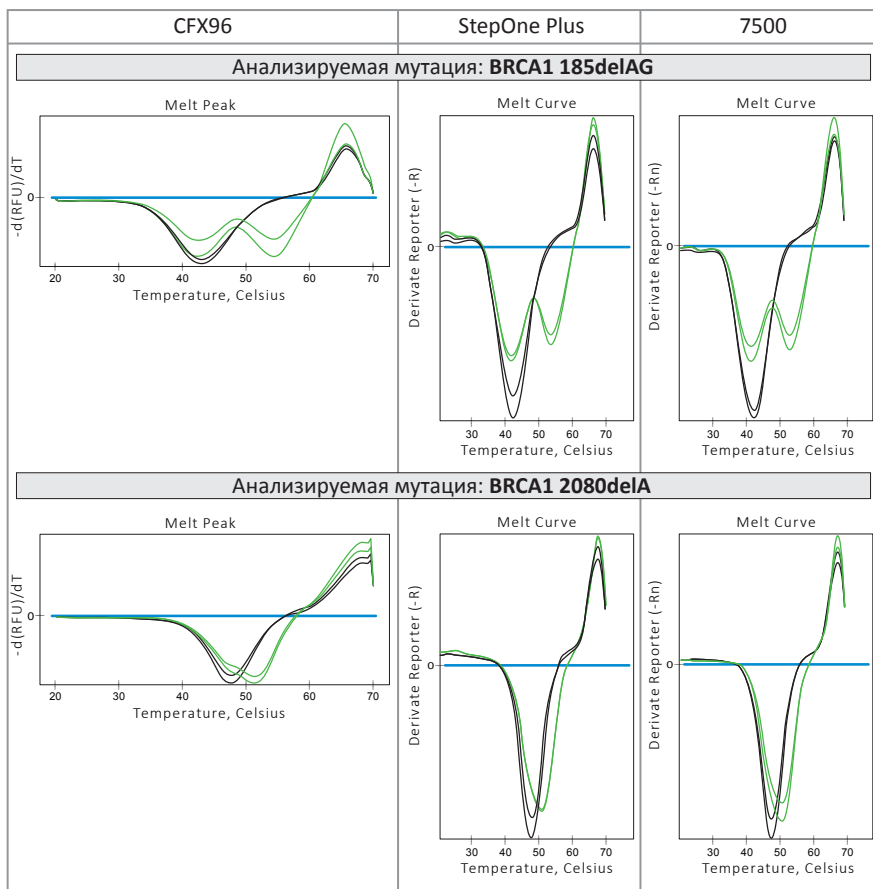


Таблица 7 – интерпретация генотипов «N» и «m».

Анализируемая мутация	Генотип «N»	Генотип «m»
BRCA1 185delAG	AG	--
BRCA1 2080delA	AA	A-
BRCA1 4153delA	AA	A-
BRCA1 5382insC	--	- C
BRCA1 c.3700 _ 3704delGTAAA	GTAAA GTAAA	GTAAA -
BRCA1 c.3756 _ 3759delGTCT	GTCTGTCT	GTCT -
BRCA1 T300G	TT	TG
BRCA2 6174delT	TT	T-

15. Условия транспортирования, хранения и использования

15.1 Набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» разрешается транспортировать всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

15.2 Транспортирование компонентов набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» осуществляется в пенопластовых термоконтейнерах с хладоэлементами в течение 5 суток при температуре от -28 до +8 °С.

15.3 Хранение набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» до и после первого вскрытия осуществляется при температуре от -28 до -10 °С.

15.4 Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, использованию не подлежит.

16. Срок годности

Срок годности 12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортирования и хранения. Набор реагентов или полученные в ходе использования смеси растворов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

17. Критерии непригодности набора реагентов для применения

Не использовать «ГенТест-М BRCA1, BRCA2», если применим хотя бы один критерий непригодности:

- при первом вскрытии обнаружено повреждение фасовочной тары компонентов;
- нет возможности плотно закрыть фасовочную тару компонентов или обнаружены протечки;
- неполная комплектность, в том числе в результате применения;
- внешний вид компонентов не соответствует описанию;
- нарушены условия хранения;
- истек срок годности;
- компоненты контаминированы ДНК человека;
- изготовитель сообщил об отзыве производственной серии, к которой относится данный набор реагентов (посредством объявления на сайте www.nomotech.ru или иным способом).

18. Гарантии изготовителя

Предприятие-изготовитель ООО «НОМОТЕК» при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» гарантирует:

- соответствие набора реагентов требованиям ТУ 20.59.52.199-024-11248074-2018;
- гарантийный срок хранения в упаковке – 12 месяцев со дня изготовления.

По истечению срока годности набор реагентов и все его компоненты применению не подлежат.

19. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость

19.1 Контроль качества набора реагентов осуществляется ОТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 20.59.52.199-024-11248074-2018.

Предприятие-изготовитель проводит приемо-сдаточные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик, внешнего вида, комплектности, упаковки, маркировки, а также проводит контроль качества сырья и компонентов.

19.2 Метрологическая прослеживаемость компонентов набора ПКО 185delAG, ПКО 2080delA, ПКО 4153delA, ПКО 5382insC, ПКО с.3700_3704delGTAAA, ПКО с.3756_3759delGTCT, ПКО Т300G, ПКО 6174delT, ОКО 185delAG, ОКО 2080delA, ОКО 4153delA, ОКО 5382insC, ОКО с.3700_3704delGTAAA, ОКО с.3756_3759delGTCT, ОКО Т300G, ОКО 6174delT обеспечена до контрольных образцов предприятия, верифицируемых секвенированием по методу Сэнгера.

20. Порядок подачи рекламаций

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться:

- ООО «НОМОТЕК» 117997 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к.16;
- md-support@nomotech.ru – техническая поддержка.

При подаче рекламации необходимо исключить низкое качество биоматериала, ошибку измерения, ошибку выполнения протокола, нарушение условий транспортирования и хранения. Если все указанные факторы исключены, необходимо обратиться в службу технической поддержки.

21. Утилизация

21.1 Наборы реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2», пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

21.2 Уничтожение наборов реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

Приложение №1

Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории и правила ее организации:

- Зонирование
- Направление потока материалов и персонала
- Размещение оборудования и уборочного инвентаря

Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории

- Однонаправленность потока персонала и материалов.
- Технологическая одежда должна быть строго индивидуальна.
- Всегда использовать перчатки. Не прикасаться к поверхностям, оборудованию, ручкам дверей, холодильников и т.д. без перчаток.
- Не перемещать при работе, уборке помещений оборудование даже в пределах одной зоны.
- Не выходить за пределы зоны в технологической одежде.
- Маркировать используемые реактивы.
- Хранить используемые реактивы (вскрытые наборы реагентов) отдельно от не использовавшихся.
- Хранить материалы, содержащие ДНК отдельно от реактивов, использующихся для приготовления реакционной смеси.
- Выделение ДНК, приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
- При работе с дозаторами использовать наконечники с фильтром. Для каждой операции менять наконечник.
- Для хранения дозаторов использовать специальную стойку.
- После перемещения пробирок всегда осаждать капли со стенок на мини-центрифуге. Избегать касания внутренней поверхности пробирок и крышек наконечником.
- Перед и после работы проверить исправность оборудования, убрать рабочее место. Для уборки ПЦР-бокса в т.ч. использовать ультрафиолет.
- После работы утилизировать использованные материалы – наконечники, пробирки и т.д. согласно регламенту лаборатории.
- Пробирки с ПЦР-продуктом не открывать в зоне №4. Для утилизации пробирок с ПЦР-продуктом в зоне №4 поместить пробирки в пакет, пакет закрыть, утилизировать.

Зонирование.

ПЦР-лаборатория для ПЦР-РВ должна включать минимальный набор рабочих зон:

- Зона №1 – для работы с геномной ДНК (выделение ДНК, подготовка образцов)
- Зона №2 – для приготовления реакционных смесей (изолирована от источника ДНК)
- Зона №3 – для внесения ДНК в реакционную смесь
- Зона №4 – для проведения ПЦР (место нахождения амплификаторов)

При необходимости возможно размещение зон №2 и №3 в одном помещении при соблюдении разделения процессов приготовления реакционных смесей и внесения ДНК в разных ПЦР-боксах.

Для работы с большим потоком биологического материала следует создать дополнительную зону № 1а для его приемки, регистрации, разбора, первичной обработки.

Для работы с ПЦР-продуктом необходимо создать дополнительную зону №5 – для манипуляций с ПЦР-продуктом (электрофорез, подготовка образцов перед секвенированием).

Перед каждой зоной должен быть оборудован санпропускник – для смены одежды на технологическую, хранения уборочного инвентаря.

Направление потока материалов и персонала.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока материалов. В зону №2 не должны попадать материалы из других зон. Для других зон действует принцип: материалы, побывавшие в зонах с большим номером, не должны перемещаться в обратном направлении. Под материалами следует понимать: пробирки, штативы, пакеты, документы и т.п.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока персонала, в т.ч. обслуживающего персонала. Люди, побывавшие в зонах с большим номером, могут перемещаться в обратном направлении только при соблюдении порядка подготовки персонала к работе (мытьё рук, смена комплекта одежды и т.д.). При работе в зоне №5 следует планировать рабочий процесс так, чтобы в этот день не возвращаться в другие зоны. Все находящиеся в лаборатории должны в каждой зоне менять одежду на технологическую: обувь, халат, шапочка, маска, перчатки, нарукавники. Технологическая одежда строго не должна перемещаться между зонами.

Размещение оборудования и уборочного инвентаря.

Каждая зона должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами. Минимальный список стационарного оборудования в зонах ПЦР-лаборатории:

- Зона №1а – центрифуга, штативы, вортекс, комплект дозаторов, комплект инструментов для работы с материалом, место для хранения материала;
- Зона №1 – ПЦР-бокс для выделения ДНК, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, термостат, штативы, морозильная камера, холодильная камера;
- Зона №2 – ПЦР-бокс для подготовки реакционной смеси, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона №3 – ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, термостат, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона №4 – амплификатор, центрифуга с ротором для стрипов и плашек;
- Зона №5 – ПЦР-бокс для работы с ПЦР-продуктом, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, штативы, прибор для проведения электрофореза, лабораторные весы, микроволновая печь, морозильная камера, холодильная камера.

Каждая зона должна быть снабжена индивидуальным уборочным инвентарем – ведро для мытья пола, швабра, тряпка для мытья пола, емкость и тряпки для мытья рабочих поверхностей, дезинфицирующие хлор- или перекись-содержащие средства. Уборочный инвентарь не должен перемещаться из одной зоны в другую.

Литература

1. Любченко Л.Н., Батенева Е.И. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. Пособие для врачей. М.: ИГ РОНЦ, 2014. 64 р.
2. Couch F.J., Nathanson K.L., Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. // Science. 2014. Vol. 343, № 6178. P. 1466–1470.
3. Karami F., Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. // Biomed Res. Int. 2013. Vol. 2013. P. 928562.
4. Батенева Е.И., Кадочникова В.В., Трофимов Д.Ю., Филиппова М.Г., Мещеряков А.А., Любченко Л.Н. Обоснование состава диагностической панели для генетического тестирования больных раком молочной железы и/или раком яичников: спектр частых мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 в российской популяции // Медицинская генетика. 2013. Vol. 12, № 7. P. 26–31.

Графические символы

	Номер по каталогу
	Код серии
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Использовать для приготовления реакционной смеси
	Только для научно-исследовательских целей
	Знак Общего количества тестов, которые могут быть выполнены с использованием реагентов, содержащихся в наборе
	Осторожно. Вредные для здоровья аллергические (раздражающие) вещества

Техническая поддержка: md-support@nomotech.ru

Изготовитель:

Общество с ограниченной ответственностью
«Новые Молекулярные Технологии» (ООО «НОМОТЕК»)

Фирменное наименование:



г. Москва, 119421

ул. Ленинский проспект, д.111, корп.1, пом. 34, эт. 3

Тел.: +7 (495) 642-29-69

www.nomotech.ru

I0015