

Инсайдер FullRAS

Набор реагентов для амплификации участков ДНК, содержащих мутации в «горячих точках» экзонов 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека *KRAS*, экзонов 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека *NRAS* и экзона 15 (с.600) гена человека *BRAF* методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («Инсайдер FullRAS»)

Кат. № R3002

Инструкция по применению

Сокращения и обозначения

| | |
|-----------------|---|
| Cq | Пороговый цикл |
| FAM | Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени |
| VIC | Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени |
| «горячая точка» | (англ. «hot spot») – участок ДНК, характеризующийся повышенной мутабельностью, в результате которой в геноме человека происходят мутации, среди которых могут быть клинически значимые |
| ДНК | Дезоксирибонуклеиновая кислота |
| КОП | Контрольный образец предприятия |
| КО без ДНК | Контрольный образец без ДНК (NTC) |
| Мишень | Значения поля «Target Name» |
| Олиго-смесь М | Обобщенное название компонентов набора: Олиго-смесь М KRAS ex 2 с.12, 13, Олиго-смесь М KRAS ex 3 с.59, 61, Олиго-смесь М KRAS ex 4 с.117, Олиго-смесь М KRAS ex 4 с.146, Олиго-смесь М NRAS ex 2 с.12, 13, Олиго-смесь М NRAS ex 3 с.59, 61, Олиго-смесь М NRAS ex 4 с.117, Олиго-смесь М NRAS ex 4 с.146, Олиго-смесь М BRAF с.600 |
| ПКО | Положительный контрольный образец |
| ПО | Программное обеспечение |
| 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 | 7 |
| 5. Количество анализируемых образцов, кратность применения..... | 8 |
| 6. Принцип действия | 9 |
| 7. Научная обоснованность анализа | 9 |
| 8. Аналитические характеристики..... | 10 |
| 9. Ограничения метода..... | 10 |
| 10. Меры предосторожности..... | 12 |
| 11. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки | 14 |
| 12. Биологический материал | 14 |
| 13. Протокол анализа образца | 15 |
| 14. Анализ данных | 22 |
| 15. Условия транспортирования, хранения и использования | 23 |
| 16. Срок годности | 23 |
| 17. Критерии непригодности набора реагентов для применения | 23 |
| 18. Гарантии изготовителя | 24 |
| 19. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость..... | 24 |
| 20. Порядок подачи рекламаций..... | 24 |
| 21. Утилизация | 24 |
| Приложение №1 | 25 |
| Литература..... | 28 |
| Графические символы..... | 29 |

1. Название, варианты исполнения

Набор реагентов для амплификации участков ДНК, содержащих мутации в «горячих точках» экзонов 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека *KRAS*, экзонов 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека *NRAS* и экзона 15 (с.600) гена человека *BRAF* методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («Инсайдер FullRAS»).

Набор реагентов «Инсайдер FullRAS» 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 «Инсайдер FullRAS», 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 предназначен для наработки ПЦР-продукта с мутациями в «горячих точках» экзонов 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека *KRAS*, экзонов 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека *NRAS* и экзона 15 (с.600) гена человека *BRAF* до количества, достаточного для секвенирования по методу Сэнгера с целью идентификации мутации. ДНК, не содержащая мутации в перечисленных участках генома, не амплифицируется и, таким образом, не влияет на идентификацию мутаций.

Таблица 1 – перечень 65 наиболее значимых мутаций в «горячих точках» экзона 15 гена *BRAF* и экзонов 2,3,4 генов *NRAS* и *KRAS*, на которых валидирован набор реагентов (возможна детекция других редко встречающихся мутаций)

| Ген, экзон, координаты региона (по сборке GRCh38/hg38) | Нуклеотидная замена | Аминокислотная замена |
|--|---------------------|-----------------------|
| <i>KRAS</i> ex2 c.12 chr12:25245343-25245355 | c.35G>A | p.G12D |
| | c.35G>T | p.G12V |
| | c.34G>T | p.G12C |
| | c.35G>C | p.G12A |
| | c.34G>A | p.G12S |
| | c.34G>C | p.G12R |
| | c.36T>C | p.G12G |
| | c.36T>A | p.G12G |
| <i>KRAS</i> ex2 c.13 chr12:25245343-25245355 | c.36T>G | p.G12G |
| | c.38G>A | p.G13D |
| | c.37G>T | p.G13C |
| | c.37G>A | p.G13S |
| | c.37G>C | p.G13R |
| | c.38G>C | p.G13A |
| | c.38G>T | p.G13V |
| | c.39C>A | p.G13G |
| <i>KRAS</i> ex3 c.59 chr12:25227339-25227351 | c.39C>T | p.G13G |
| | c.39C>G | p.G13G |
| <i>KRAS</i> ex3 c.61 chr12:25227339-25227351 | c.175G>A | p.A59T |
| | c.176C>G | p.A59G |
| | c.183A>C | p.Q61H |
| | c.182A>G | p.Q61R |
| | c.182A>T | p.Q61L |
| | c.183A>T | p.Q61H |
| <i>KRAS</i> ex4 c.117 chr12:25225705-25225721 | c.181C>A | p.Q61K |
| | c.182A>C | p.Q61P |
| | c.351A>T | p.K117N |
| | c.351A>C | p.K117N |
| <i>KRAS</i> ex4 c.146 chr12:25225622-25225635 | c.349A>G | p.K117E |
| | c.350A>G | p.K117R |
| | c.436G>A | p.A146T |
| <i>KRAS</i> ex4 c.146 chr12:25225622-25225635 | c.437C>T | p.A146V |
| | c.436G>C | p.A146P |
| | c.436G>T | p.A146S |

| Ген, экзон, координаты региона (по сборке GRCh38/hg38) | Нуклеотидная замена | Аминокислотная замена |
|---|---------------------|-----------------------|
| <i>NRAS</i> ex2 c.12 chr1:114716119-114716131 | c.35G>A | p.G12D |
| | c.34G>A | p.G12S |
| | c.34G>T | p.G12C |
| | c.35G>T | p.G12V |
| | c.35G>C | p.G12A |
| | c.34G>C | p.G12R |
| | c.36T>C | p.G12G |
| <i>NRAS</i> ex2 c.13 chr1:114716119-114716131 | c.38G>A | p.G13D |
| | c.37G>C | p.G13R |
| | c.38G>T | p.G13V |
| | c.37G>T | p.G13C |
| | c.37G>A | p.G13S |
| | c.38G>C | p.G13A |
| | c.39T>C | p.G13G |
| <i>NRAS</i> ex3 c.59 chr1:114713918-114713906 | c.175G>A | p.A59T |
| | c.176C>A | p.A59D |
| <i>NRAS</i> ex3 c.61 chr1:114713918-114713906 | c.182A>G | p.Q61R |
| | c.181C>A | p.Q61K |
| | c.182A>T | p.Q61L |
| | c.183A>T | p.Q61H |
| | c.183A>C | p.Q61H |
| | c.182A>C | p.Q61P |
| | c.181C>G | p.Q61E |
| <i>NRAS</i> ex4 c.117 chr1:114709676-114709663 | c.351G>C | p.K117N |
| | c.351G>T | p.K117N |
| <i>NRAS</i> ex4 c.146 chr1:114709587-114709576 | c.436G>A | p.A146T |
| | c.437C>T | p.A146V |
| <i>BRAF</i> ex15 c.600 chr7:140753329-140753343 | c.1799T>A | p.V600E |
| | c.1798_1799GT>AA | p.V600K |
| | c.1798_1799GT>AG | p.V600R |
| | c.1799_1800TG>AA | p.V600E |

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 Insider | 6.6 мл | 6 пробирок по 1.1 мл | Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании. | Содержит Taq-полимеразу, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg ²⁺ и реакционный буфер. |
| Вода деионизированная | 21 мл | 14 пробирок по 1.5 мл | Жидкость прозрачная бесцветная. | Контрольный образец без ДНК для подтверждения отсутствия контаминации. Для приготовления реакционных смесей. |
| Олиго-смесь M KRAS ex 2 с.12, 13 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr12:25245343-25245355, ЭВК. |
| Олиго-смесь M KRAS ex 3 с.59, 61 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr12:25227339-25227351, ЭВК. |
| Олиго-смесь M KRAS ex 4 с.117 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr12:25225705-25225721, ЭВК. |
| Олиго-смесь M KRAS Ex 4 с.146 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr12:25225622-25225635, ЭВК. |
| Олиго-смесь M NRAS ex 2 с.12, 13 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr1:114716119-114716131, ЭВК. |
| Олиго-смесь M NRAS ex 3 с.59, 61 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr1:114713918-114713906, ЭВК. |

| Компонент | Объем | Фасовка | Внешний вид | Функциональное назначение |
|-------------------------------|---------|------------|--|---|
| Олиго-смесь M NRAS ex 4 с.117 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr1:114709587-114709576, ЭВК. |
| Олиго-смесь M NRAS ex 4 с.146 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55191828-55191838, ЭВК. |
| Олиго-смесь M M BRAF с.600 | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:140753329-140753343, ЭВК. |
| Олиго-смесь O | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка геномной ДНК независимо от мутационного статуса исследуемых участков ДНК, ЭВК. |
| Олиго-смесь K | 1.3 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бледно-розовая. | Содержит олигонуклеотиды для оценки качества анализируемой ДНК, ЭВК. |
| Праймер для секвенирования | 0.55 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бесцветная. | Содержит олигонуклеотид, необходимый для секвенирования по методу Сэнгера. |
| ПКО FullRAS | 1.3 мл | 1 пробирка | Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании. | Содержит ДНК с мутантными копиями исследуемых участков ДНК. Контроль прохождения ПЦР и верного определения мутационного статуса исследуемого региона. |

5. Количество анализируемых образцов, кратность применения

Набор реагентов рассчитан на 100 реакций и позволяет проанализировать от 13 до 55 образцов (в двух повторах или без повторов соответственно). Максимальное количество анализируемых образцов достигается при одновременной постановке 5 образцов на первом и втором этапах анализа (при условии анализа на втором этапе по всем мутациям одновременно). Набор реагентов рассчитан на однократное, в том числе дробное, применение.

6. Принцип действия

Опухолевые ткани генетически гетерогенны и содержание в них клинически значимых мутаций может варьировать в широких пределах. В случае малого количества копий мутантной ДНК в образце, достоверная детекция мутаций стандартными методами становится невозможной из-за ограничений методик (аллель-специфическая ПЦР, секвенирование по Сэнгеру исходной ДНК и т.д.).

В процессе наработки ПЦР-продукта набором реагентов «Инсайдер FullRAS» увеличивается количество мутантных копий ДНК, что позволяет провести анализ образца секвенированием по методу Сэнгера.

Анализ образца проходит в два этапа: оценка качества образца и наработка ПЦР-продукта с мутациями в «горячих точках».

В основе метода оценки качества образца – полимеразная цепная реакция с детекцией сигнала в режиме реального времени. По значениям *Cq* по каналу FAM позволяют оценить количество ДНК; по каналу VIC – качество ДНК.

Для наработки ПЦР-продукта с мутантной ДНК используется мутационно-специфическая полимеразная цепная реакция с детекцией сигнала в режиме реального времени (реакция «М»). В реакции «М» амплифицируется исследуемый регион, содержащий мутации. Специфическая амплификация региона с мутацией происходит за счет содержания в «Олиго-смеси М» модифицированного олигонуклеотида, имеющего высокое сродство к референсной последовательности. Т.е. при наличии в регионе хотя бы одной мутации не образуется дуплекс матрица – модифицированный олигонуклеотид. В результате освобождается место для посадки праймера, что обеспечивает прохождение ПЦР-реакции. Пригодность ПЦР-продукта для секвенирования по методу Сэнгера определяется путем сравнения значений *Cq* исследуемого образца в реакциях с олиго-смесью «О» и «М» со значениями *Cq* ПКО.

Для контроля качества прохождения ПЦР-реакций в состав олиго-смесей «К», «О» и «М» входит экзогенный внутренний контроль (ЭВК).

7. Научная обоснованность анализа

Гены человека *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* кодируют ферменты-компоненты сигнального каскада RTK-RAS-RAF-MEK, регулирующего пролиферацию и дифференцировку клеток. Мутации в «горячих точках» экзонов 2 (с.12, с.13), 3 (с.59, с.61), 4 (с.117, с.146) генов *NRAS* и *KRAS* и мутация в экзоне 15 (с.600; мутация V600) гена *BRAF* приводят к гиперактивации белков, из-за чего происходит формирование и малигнизация опухолей.¹⁻⁴

Наиболее часто вышеперечисленные мутации встречаются при колоректальном раке, меланоме, аденокарциноме лёгких, глиобластоме и аденокарциноме поджелудочной железы с прогностической значимостью.^{3,5-7} Помимо роли в канцерогенезе описанные мутации ассоциированы с чувствительностью опухолей к терапевтическим препаратам – анти-EGFR антителам, ингибиторам MEK1, ингибиторам BRAF.

8. Аналитические характеристики

| Наименование показателя | Характеристика и норма |
|---|--|
| Предел обнаружения (минимальное количество копий ДНК с Мутацией, достаточное для подготовки ПЦР-продукта, пригодного для секвенирования по методу Сэнгера) | 150 копий мутантной ДНК |
| Аналитическая специфичность (под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов «Инсайдер FullRAS» специфически амплифицировать участки ДНК, содержащие мутации, что обеспечивается с помощью специфически подобранных олигонуклеотидов, проверенных на контрольных образцах) | В реакциях с положительным контрольным образцом – проходит амплификация участков ДНК, содержащих мутации в «горячих точках» экзонов 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека <i>KRAS</i> , экзонов 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека <i>NRAS</i> и экзона 15 (с.600) гена человека <i>BRAF</i> . В реакциях с контрольным образцом без ДНК – ДНК не амплифицируется. |

9. Ограничения метода

9.1 Информация об интерферирующих веществах

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Инсайдер FullRAS» была проведена оценка влияния потенциально интерферирующих веществ (парафина), содержащихся в биоматериале, после выделения из него ДНК с помощью набора реагентов «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, производства ООО «НОМОТЕК», номер регистрационного удостоверения РЗН 2019/9172 от 14.04.2020. Для проведения испытаний были подготовлены образцы с разным соотношением фиксированной ткани в срезе и парафина:

| | |
|--|---|
| Образец, отвечающим требованиям инструкции по применению набора реагентов «ЭкстрактДНК FFPE» | Площадь парафина – 6 см ² . Площадь ткани – 2 см ² . |
| Образец с заниженным содержанием ткани | Площадь парафина – 7 см ² . Площадь ткани – 1 см ² . |
| Образец с заниженным содержанием парафина | Площадь парафина – 5 см ² . Площадь ткани – 2 см ² . |
| Образец с повышенным содержанием парафина | Площадь парафина – 7 см ² . Площадь ткани – 2 см ² . |
| Образец с повышенным содержанием парафина | Площадь парафина – 8 см ² . Площадь ткани – 2 см ² . |
| Образец с повышенным содержанием парафина | Площадь парафина – 9 см ² . Площадь ткани – 2 см ² . |

Проведенные испытания подтверждают требования, заявленные в инструкции по применению к набору реагентов «Экстракт ДНК FFPE», к составу среза с FFPE-блоков (соотношение ткань-парафин), при этом существенным для сохранения эффективности набора реагентов является условие, при котором суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани и комплексов клеток человека должна быть не менее 2 см²; в свою очередь, увеличение содержания парафина в исходном образце с 6 до 9 см² не влияет на эффективность выделения ДНК из образца.

9.2 Диапазон определения мутантных копий ДНК

Предел обнаружения (150 копий мутантной ДНК) рассчитан для образцов с концентрацией 2 нг/мкл (10 нг в реакции), в которых содержится 5% мутантной ДНК; диапазон стандартной ошибки – от 125 до 172 копий. На рисунке 1 изображена зависимость минимально возможного детектируемого % мутантной ДНК от общего количества ДНК в условиях сохранения предела обнаружения.

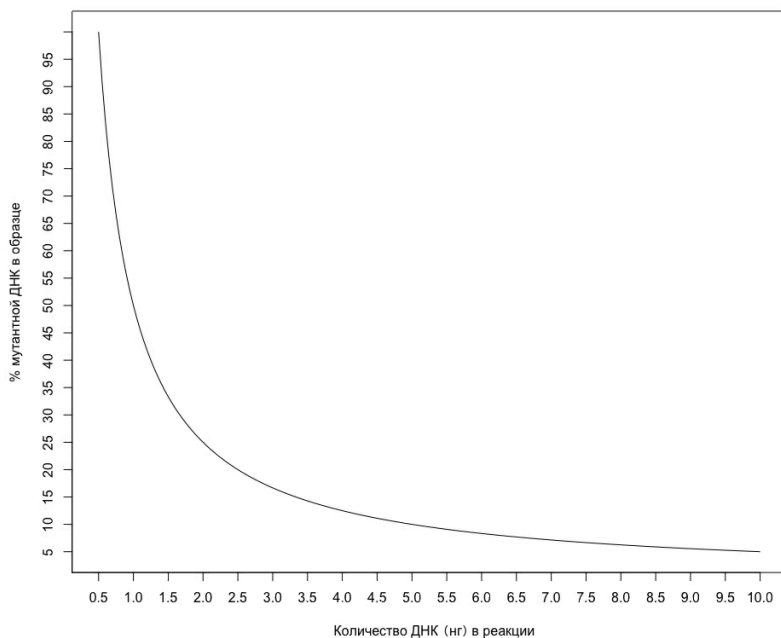


Рисунок 1 – зависимость количества ДНК в реакции и % мутантной ДНК.

9.3 Совместимость с приборами

Набор реагентов совместим с приборами:

- 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;
- 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);
 - 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 0.2 мл (Кат. № SSI-3247-00, Производитель: SSI, США);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и 2.0 мл;
- Мини-центрифуга/вортекс;
- Термостат.

12. Биологический материал

ДНК, выделенная из FFPE-блока набором реагентов:

- «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, кат.№ M1001 производства ООО «НОМОТЕК», номер регистрационного удостоверения РЗН 2019/9172 от 14.04.2020;
- «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для применения в научно-исследовательских целях» по ТУ 9398-001-11248074-2017, кат.№ R1001 производства ООО «НОМОТЕК».

Хранить и транспортировать препарат ДНК при температуре от -28 до -10 °С в течение 1 месяца, с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

13. Протокол анализа образца

13.1 Оценка качества ДНК

На этапе оценки качества ДНК проводится анализ образца с целью выбора разведения ДНК (4х, 8х или 16х) для использования его на этапе наработки ПЦР-продукта с мутациями.

Максимальное число образцов, которое возможно проанализировать набором реагентов «Инсайдер FullRAS», достигается при одновременной постановке не менее 5 образцов (без повторов).

13.1.1 Приготовление реакционной смеси

1. Разморозить при температуре от +15 до +30 °С компоненты: «ПЦР-смесь Insider», «Вода деионизированная», «Олиго-смесь К».
2. Содержимое пробирок тщательно перемешать четырехкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортке 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 (N) в зависимости от формата постановки:
 - образцы анализируются без повторов;
 - образцы анализируются в 2-х повторах.

Таблица 3 – расчет количества компонентов (ПКО и контрольный образец без ДНК учтены в формуле)

| Реакционная смесь | Образцы анализируются без повторов | Образцы анализируются в 2-х повторах |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Вода деионизированная | $10.5 \times (N \times 3 + 4)$ | $10.5 \times (N \times 6 + 4)$ |
| ПЦР-смесь Insider | $5.25 \times (N \times 3 + 4)$ | $5.25 \times (N \times 6 + 4)$ |
| Олиго-смесь К | $5.25 \times (N \times 3 + 4)$ | $5.25 \times (N \times 6 + 4)$ |

4. Приготовить реакционную смесь.

Менять наконечники между компонентами!

5. Тщательно перемешать реакционную смесь встряхиванием на вортке в течение 10 с; сбросить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 5 с.
6. Подготовить пробирки для ПЦР (стрипы; 1 стрип – 8 пробирок) в количестве $N \times 3 + 4$ или $N \times 6 + 4$ (в зависимости от выбранного формата постановки): установить в штатив, промаркировать.

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

7. Внести по 20 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.
8. Добавить по 5 мкл «Вода деионизированная», которая использовалась для приготовления реакционной смеси, в 2 пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышки пробирок. При программировании амплификатора обозначить эти образцы, как «Контрольный образец без ДНК» (НТС).

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

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

13.1.2 Подготовка образцов

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

11. Разморозить при температуре +50 °С исследуемые образцы ДНК.

12. После разморозки все образцы перемешать встряхиванием на вортексе, сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

13. Подготовить разведения исследуемых образцов:

- для каждого образца подготовить по 3 чистые пробирки;
- промаркировать пробирки, сохраняя название образца и степень разведения: 4х, 8х, 16х;
- внести «Воду деионизированную» в пробирки: 9 мкл в пробирку 4х, 6 мкл – в 8х, 6 мкл – в 16х;
- в пробирку для разведения 4х внести 3 мкл образца;

Закрывать пробирку, перемещать содержимое на вортексе в течение 5 с, сбросить капли центрифугированием. Повторять после приготовления всех разведений.

- в пробирку для разведения 8х внести 6 мкл разведения 4х;
- в пробирку для разведения 16х внести 6 мкл разведения 8х.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку!

Пробирку с «Водой деионизированной» при дальнейшем использовании не вносить в ПЦР-бокс для приготовления реакционных смесей. Использовать для приготовления других разведений ДНК.

14. Добавить по 5 мкл подготовленных разведений ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышки пробирок сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

15. Добавить по 5 мкл «ПКО FullRAS» в оставшиеся 2 пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышки пробирок.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

16. Проверить плотность закрытия крышек пробирок.

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

18. Сбросить капли центрифугированием в течение 10 с.

13.1.3 Проведение ПЦР

19. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

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

– программа амплификации:

| Этап | Температура, °С | Продолжительность | Считывание флуоресценции |
|---------------------------|-----------------|-------------------|--------------------------|
| Инкубация | 95 | 3 мин | – |
| Амплификация 50 циклов | 95 | 10 с | – |
| | 60 | 30 с | FAM, VIC |
| | 72 | 30 с | – |

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

– для всех образцов, включая контрольные, выбрать каналы детекции FAM и VIC;

– в поле «Sample Name» ввести названия и степень разведения исследуемых образцов, а также названия контрольных образцов (РКО и NTC);

– запустить программу амплификации.

13.1.4 Выбор образца надлежащего качества

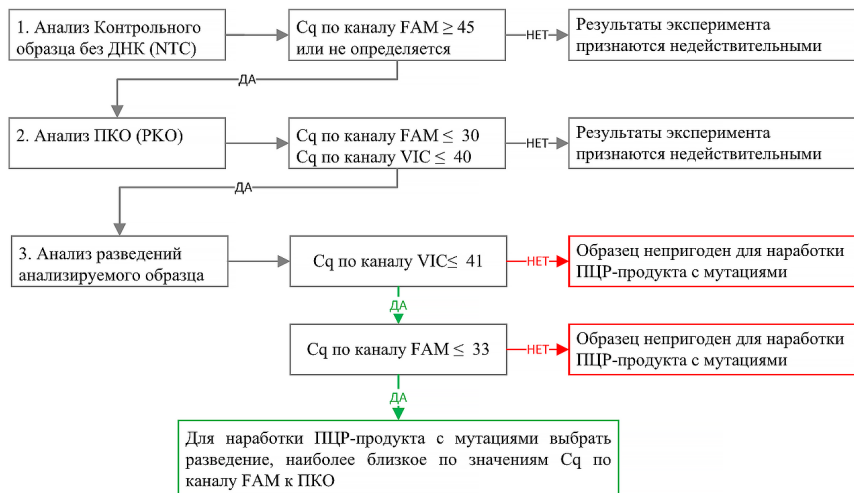
21. В программном обеспечении амплификатора открыть ПЦР-файл с результатами и изменить значения «Baseline Cycles» так, чтобы часть графика флуоресценции до начала экспоненциального роста сигнала стала параллельна оси абсцисс и близка к нулю по оси ординат.

22. По каналам FAM и VIC установить «Threshold» на уровне начала экспоненциального роста сигнала (накопления ПЦР-продукта).

23. Выбрать разведение образца для наработки ПЦР-продукта с мутацией, используя Схему 1.

Для образцов, поставленных в повторах, значения C_q считать, как среднее.

Схема 1 – анализ разведений исследуемого образца



13.2 Нарботка ПЦР-продукта с мутациями

Максимальное число образцов, которое возможно проанализировать набором реагентов «Инсайдер FullRAS», достигается при одновременной постановке не менее 5 образцов (без повторов).

13.2.1 Приготовление реакционных смесей

1. В ПЦР-боксе для приготовления реакционных смесей разморозить при температуре от +15 до +30 °С компоненты: «ПЦР-смесь Insider», «Вода деионизированная», «Олиго-смесь О» и «Олиго-смесь М» (все девять или некоторые из них, в зависимости от анализируемого участка ДНК).

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 (N) в зависимости от формата постановки:

- образцы анализируются без повторов;
- образцы анализируются в 2-х повторах.

Для каждой постановки ПЦР готовить одну реакционную смесь с олиго-смесью «О».

Для каждой «Олиго-смеси» реакционная смесь готовится отдельно.

Таблица 4 – расчет количества компонентов (ПКО и контрольный образец без ДНК учтены в формуле)

| Реакционная смесь | Образцы анализируются без повторов | Образцы анализируются в 2-х повторах |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Вода деионизированная | $10.5 \times (N + 4)$ | $10.5 \times (N \times 2 + 4)$ |
| ПЦР-смесь Insider | $5.25 \times (N + 4)$ | $5.25 \times (N \times 2 + 4)$ |
| Олиго-смесь | $5.25 \times (N + 4)$ | $5.25 \times (N \times 2 + 4)$ |

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) в количестве $N + 4$ или $N \times 2 + 4$ (в зависимости от выбранного формата постановки): установить в штатив, промаркировать.

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

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

Менять наконечники между разными реакционными смесями!

На Рисунке 2 представлена рекомендуемая схема расположения ПЦР-пробирок при одновременном анализе по всем мутациям 5 образцов без повторов.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | И01 | И02 | И03 | И04 | И05 | PKO | PKO | NTC | NTC | И01 | NTC | И01 |
| B | И01 | И02 | И03 | И04 | И05 | PKO | PKO | NTC | NTC | И02 | NTC | И02 |
| C | И01 | И02 | И03 | И04 | И05 | PKO | PKO | NTC | NTC | И03 | | И03 |
| D | И01 | И02 | И03 | И04 | И05 | PKO | PKO | NTC | NTC | И04 | | И04 |
| E | И01 | И02 | И03 | И04 | И05 | PKO | PKO | NTC | NTC | И05 | | И05 |
| F | И01 | И02 | И03 | И04 | И05 | PKO | PKO | NTC | NTC | PKO | NTC | PKO |
| G | И01 | И02 | И03 | И04 | И05 | PKO | PKO | NTC | NTC | PKO | NTC | PKO |
| H | И01 | И02 | И03 | И04 | И05 | PKO | PKO | NTC | NTC | | | |

Рисунок 2 – схема, имитирующая расположение ПЦР-пробирок в блоке амплификатора.

Обозначение образцов на схеме:

| | |
|-------------------------|-----------------------------|
| И01, И02, И03, И04, И05 | Исследуемые образцы |
| NTC | Контрольный образец без ДНК |
| PKO | PKO FullRAS |

Расположение реакционных смесей на схеме:

| Расположение | Реакционная смесь |
|---------------|----------------------------------|
| A1-A9 | Олиго-смесь M KRAS ex 2 с.12, 13 |
| B1-B9 | Олиго-смесь M KRAS ex 3 с.59, 61 |
| C1-C9 | Олиго-смесь M KRAS ex 4 с.117 |
| D1-D9 | Олиго-смесь M KRAS ex 4 с.146 |
| E1-E9 | Олиго-смесь M NRAS ex 2 с.12, 13 |
| F1-F9 | Олиго-смесь M NRAS ex 3 с.59, 61 |
| G1-G9 | Олиго-смесь M NRAS ex 4 с.117 |
| H1-H9 | Олиго-смесь M NRAS ex 4 с.146 |
| 10-11 столбец | Олиго-смесь M BRAF с.600 |
| 11-12 столбцы | Олиго-смесь O |

8. Добавить по 5 мкл «Вода деионизированная», которая использовалась для приготовления реакционной смеси, в соответствующие пробирки для ПЦР (обозначены на рисунке 2 как NTC). Плотно 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.

13.2.2 Подготовка образцов

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

11. Разморозить при температуре +50 °С исследуемые образцы ДНК.

12. После разморозки все образцы перемешать встряхиванием на вортексе, сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

13. Подготовить разведения исследуемых образцов, выбранные в п.13.1.4:

- для каждого образца подготовить 1 пробирку для разведения;
- промаркировать пробирку, сохраняя название образца и степень выбранного разведения;
- внести в пробирки сначала «Воду деионизированную», затем образец ДНК в количестве:

| Степень разведения | Вода, мкл | ДНК, мкл |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 4x | $3,75 \times (Z+2) \times Y$ | $1,25 \times (Z+2) \times Y$ |
| 8x | $4,375 \times (Z+2) \times Y$ | $0,625 \times (Z+2) \times Y$ |
| 16x | $4,6875 \times (Z+2) \times Y$ | $0,3125 \times (Z+2) \times Y$ |

Где:
Z – количество только олиго-смесей M
Y – количество повторов образца
Допустимо округлять полученные значения, сохраняя пропорцию между количеством воды и ДНК

Закрывать пробирку, перемещать содержимое на вортексе в течение 5 с, сбросить капли центрифугированием.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку!

Пробирку с «Водой деионизированной» при дальнейшем использовании не вносить в ПЦР-бокс для приготовления реакционных смесей. Использовать для приготовления других разведений ДНК.

14. Добавить по 5 мкл разведенной ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР. Рекомендуемое расположение образцов представлено на Рисунке 2. Плотнo закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

15. Добавить по 5 мкл «ПКО FullIRAS» в соответствующие пробирки для ПЦР (обозначены на Рисунке 2 как РКО). Плотнo закрыть крышки пробирки сразу после внесения контрольного образца.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

16. Проверить плотность закрытия крышек пробирок.

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

18. Сбросить капли центрифугированием в течение 10 с.

13.2.3 Проведение ПЦР

19. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

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

- программа амплификации:

| Этап | Температура, °C | Продолжительность | Считывание флуоресценции |
|---------------------------|-----------------|-------------------|--------------------------|
| Инкубация | 95 | 3 мин | – |
| Амплификация 50 циклов | 95 | 10 с | – |
| | 60 | 30 с | FAM, VIC |

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

- для всех образцов, включая контрольные, выбрать каналы детекции FAM и VIC;

- в поле «Target Name» ввести названия мишеней:

| Имя мишени по каналу FAM (согласно используемой олиго-смеси) | Имя мишени по каналу VIC |
|---|--------------------------|
| KRAS с.12, 13 | IPC |
| KRAS с.59, 61 | |
| KRAS с.117 | |
| KRAS с.146 | |
| NRAS с.12, 13 | |
| NRAS с.59, 61 | |
| NRAS с.117 | |
| NRAS с.146 | |
| BRAF с.600 | |
| 0 | |

- в поле «Sample Name» ввести названия контрольных образцов:

| Контрольный образец | Название контрольного образца в плашке ПЦР |
|-----------------------------|--|
| Контрольный образец без ДНК | NTC |
| ПКО FullRAS | PKO |

- в поле «Sample Name» ввести названия исследуемых образцов. Не вводить одинаковые названия для разных образцов;

- запустить программу амплификации.

14. Анализ данных

Анализ данных ПЦР провести с помощью программного обеспечения «ПО Инсайдер FullRAS», кат. № W3002, производства ООО «НОМОТЕК».

15. Условия транспортирования, хранения и использования

15.1 Набор реагентов «Инсайдер FullRAS» разрешается транспортировать всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

15.2 Транспортирование набора реагентов «Инсайдер FullRAS» осуществляется в пенопластовых термоконтейнерах с хладоэлементами в течение 5 суток при температуре от -28 до +8°C.

15.3 Хранение набора реагентов «Инсайдер FullRAS» до и после первого вскрытия осуществляется при температуре от -28 до -10°C.

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 «Инсайдер FullRAS», 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 «Инсайдер FullRAS» гарантирует:

- соответствие набора реагентов требованиям ТУ 20.59.52.199-017-11248074-2018;
- 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 20.59.52.199-017-11248074-2018.

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 ПКО FullRAS 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 «Инсайдер FullRAS», пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

21.2 Уничтожение наборов реагентов «Инсайдер FullRAS» 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, используемых 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 осажать 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. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. // Nat. Rev. Cancer. 2003. Vol. 3, № 1. P. 11–22.
2. Simanshu D.K., Nissley D. V., McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease // Cell. 2017. Vol. 170, № 1. P. 17–33.
3. Dankner M. et al. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. // Onco-gene. 2018. Vol. 37, № 24. P. 3183–3199.
4. Wan P.T.C. et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of BRAF. // Cell. 2004. Vol. 116, № 6. P. 855–867.
5. Imperial R. et al. Comprehensive pancancer genomic analysis reveals (RTK)-RAS-RAF-MEK as a key dysregulated pathway in cancer: Its clinical implications. // Semin. Cancer Biol. 2017.
6. Kodaz H. Frequency of RAS Mutations (KRAS, NRAS, HRAS) in Human Solid Cancer // Eurasian J. Med. Oncol. 2017.
7. Tao L. et al. Prognostic significance of K-ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis // World J. Surg. Oncol. 2016. Vol. 14, № 1. P. 146.

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 |

Эта страница намеренно оставлена пустой

Эта страница намеренно оставлена пустой

Техническая поддержка: md-support@nomotech.ru

Изготовитель:

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

Фирменное наименование:

 **НОМОТЕК**

г. Москва, 119421

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

Тел.: +7 (968) 333 43 85

www.nomotech.ru

I0021