

Инсайдер EGFR ex20 S768I, ins

Набор реагентов для амплификации участков ДНК, содержащих мутации в «горячих точках» экзона 20 гена человека *EGFR*, методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («Инсайдер EGFR ex20 S768I, ins»)

Кат. № R3005

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	Значение поля «Target Name»
Олиго-смесь М	Обобщенное название компонентов набора: Олиго-смесь М EGFR ex20 S768I, Олиго-смесь М EGFR ex20 D770_N771insG
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	5
5. Количество анализируемых образцов, кратность применения.....	6
6. Принцип действия	6
7. Научная обоснованность анализа	7
8. Аналитические характеристики.....	7
9. Ограничения метода.....	8
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	20
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 амплификации участков ДНК, содержащих мутации в «горячих точках» экзона 20 в гене человека *EGFR*, методом ПЦР в режиме реального времени для применения в научно-исследовательских целях («Инсайдер EGFR ex20 S768I, ins»).

Набор реагентов «Инсайдер EGFR ex20 S768I, ins» 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 EGFR ex20 S768I, ins», 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» экзона 20 гена человека *EGFR* до количества, достаточного для секвенирования по методу Сэнгера с целью идентификации мутации. ДНК, не содержащая мутации в указанном участке генома, не амплифицируется и, таким образом, не влияет на идентификацию мутаций.

Таблица 1 – перечень наиболее значимых мутаций в «горячих точках» экзона 20 гена человека *EGFR*, на которых валидирован набор реагентов (возможна детекция других редко встречающихся мутаций)

Ген, экзон, координаты региона (по сборке GRCh38/hg38)	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена
<i>EGFR</i> ex 20 chr7:55181306-55181316	c.2303G>T	p.S768I
<i>EGFR</i> ex 20 chr7:55181315-55181324	c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG

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	3.3 мл	3 пробирки 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	10.5 мл	7 пробирок по 1.5 мл	Жидкость прозрачная бесцветная.	Контрольный образец без ДНК для подтверждения отсутствия контаминации. Для приготовления реакционных смесей.
Олиго-смесь M EGFR ex20 S768I	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55181306-55181316, ЭВК.
Олиго-смесь M EGFR ex20 D770_N771insG	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55181315-55181324, 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 EGFR	1.1 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 20 до 84 образцов (без повторов). Максимальное количество анализируемых образцов достигается при одновременной постановке 30 образцов на первом этапе анализа и 28 – на втором. 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 EGFR ex20 S768I, ins» 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» экзона 20 гена человека *EGFR*.

В основе метода оценки качества образца – полимеразная цепная реакция с детекцией сигнала в режиме реального времени. По значениям *C_q* 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 *C_q* исследуемого образца в реакциях с олиго-смесью «О» и «М» со значениями *C_q* ПКО.

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

7. Научная обоснованность анализа

Ген человека *EGFR* кодирует трансмембранный рецептор эпидермального фактора роста. Мутации в «горячих точках» экзонов 18, 19, 20, 21 гена *EGFR* приводят к гиперактивации кодируемого белка, из-за чего блокируется апоптоз и стимулируются пролиферация клеток, их малигнизация и метастазирование.¹⁻³ Мутации в «горячих точках» *EGFR* определяют ответ опухоли на тирозинкиназно-ингибиторную терапию и развитие резистентности.

Таблица 3 – частоты встречаемости мутаций в «горячих точках» экзона 20 гена человека *EGFR* при немелкоклеточном раке легкого и их связь с таргетными препаратами

Мутации	Изменение чувствительности к таргетной терапии при возникновении мутации	Частота встречаемости мутации
Инсерция в экзоне 20	Сниженный эффект от терапии ингибиторами тирозинкиназы	4-10% [4,5]
Экзон 20 S768I	Повышенная чувствительность к ингибиторам тирозинкиназы	2-3% [6]

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 EGFR ex20 S768I, ins» 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» экзона 20 гена человека <i>EGFR</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 EGFR ex20 S768I, ins» 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 «ЭкстрактДНК 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.

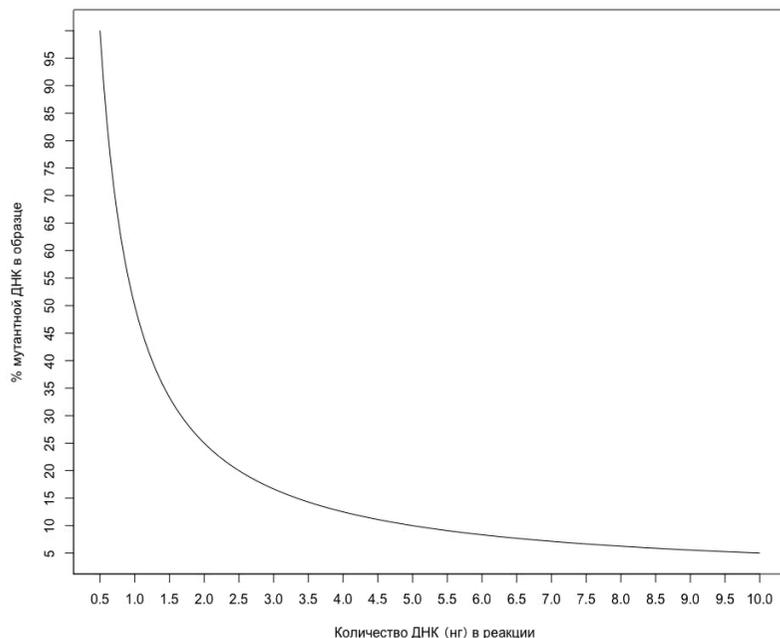


Рисунок 1 – зависимость количества ДНК в реакции и % мутантной ДНК.

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 Лабораторизез, 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 EGFR ex20 S768I, ins», достигается при одновременной постановке не менее 30 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 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.

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	$10.5 \times (N \times 3 + 4)$	$10.5 \times (N \times 6 + 4)$
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 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 $N \times 3 + 4$ 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. Закрыть 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;

Закрыть 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 EGFR» 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

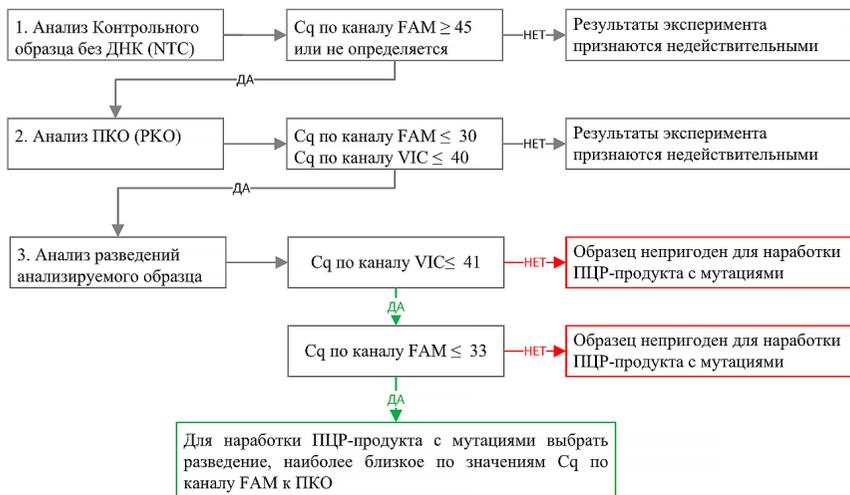
21. В программном обеспечении амплификатора открыть ПЦР-файл с результатами и изменить значения «Baseline Cycles» так, чтобы часть графика флуоресценции до начала экспоненциального роста сигнала стала параллельна оси абсцисс и близка к нулю по оси ординат.

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 S_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 EGFR ex20 S768I, ins», достигается при одновременной постановке не менее 28 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 O» и «Олиго-смесь M» (обе или одну 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 «O».

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

Таблица 5 – 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 28 образцов без повторов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	И01	И09	И017	И025	И01	И09	И017	И025	И01	И09	И017	И025
B	И02	И010	И018	И026	И02	И010	И018	И026	И02	И010	И018	И026
C	И03	И011	И019	И027	И03	И011	И019	И027	И03	И011	И019	И027
D	И04	И012	И020	И028	И04	И012	И020	И028	И04	И012	И020	И028
E	И05	И013	И021	PKO	И05	И013	И021	PKO	И05	И013	И021	PKO
F	И06	И014	И022	PKO	И06	И014	И022	PKO	И06	И014	И022	PKO
G	И07	И015	И023	NTC	И07	И015	И023	NTC	И07	И015	И023	NTC
H	И08	И016	И024	NTC	И08	И016	И024	NTC	И08	И016	И024	NTC

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

Обозначение образцов на схеме:

И01-И028	Исследуемые образцы
NTC	Контрольный образец без ДНК
PKO	PKO EGFR

Расположение реакционных смесей на схеме:

Расположение	Реакционная смесь
A1 – H4	Олиго-смесь M EGFR ex20 S768I
A5 – H8	Олиго-смесь M EGFR ex20 D770 _ N771insG
A9 – H12	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 PKO 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. Плотно 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 EGFR» в соответствующие пробирки для ПЦР (обозначены на рисунке 2 как РК0). Плотно 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, °С	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
EGFR ex20 S768I	IPC
EGFR ex20 ins	
0	

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

Контрольный образец	Название контрольного образца в плашке ПЦР
Контрольный образец без ДНК	NTC
ПКО EGFR	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 EGFR», кат. № W3001, производства ООО «НОМОТЕК».

15. Условия транспортирования, хранения и использования

15.1 Набор реагентов «Инсайдер EGFR ex20 S768I, ins» разрешается транспортировать всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

15.2 Транспортирование набора реагентов «Инсайдер EGFR ex20 S768I, ins» осуществляется в пенопластовых термоконтейнерах с хладоэлементами в течение 5 суток при температуре от -28 до +8°C.

15.3 Хранение набора реагентов «Инсайдер EGFR ex20 S768I, ins» 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 EGFR ex20 S768I, ins», 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 загрязнены 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 EGFR ex20 S768I, ins» гарантирует:

- соответствие набора реагентов требованиям ТУ 20.59.52.199-037-11248074-2018;
- 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 20.59.52.199-037-11248074-2018.

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 EGFR 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 EGFR ex20 S768I, ins», пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

21.2 Уничтожение наборов реагентов «Инсайдер EGFR ex20 S768I, ins» 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 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. Yun C.-H. et al. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell*. 2007. 11(3): 217–227.
2. Mosesson Y., Yarden Y. Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Semin Cancer Biol*. 2004. 14(4): 262–270.
3. Woodburn J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 82 (2-3): 241–250.
4. Mitsudomi T., Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer // *FEBS J*. 2010. Vol. 277, № 2. P. 301–308.
5. Arcila M.E. et al. Rebiopsy of Lung Cancer Patients with Acquired Resistance to EGFR Inhibitors and Enhanced Detection of the T790M Mutation Using a Locked Nucleic Acid-Based Assay // *Clin. Cancer Res*. 2011. Vol. 17, № 5. P. 1169–1180.
6. Costa D.B. Kinase inhibitor-responsive genotypes in EGFR mutated lung adenocarcinomas: moving past common point mutations or indels into uncommon kinase domain duplications and rearrangements // *Transl. Lung Cancer Res*. 2016. Vol. 5, № 3. P. 331–337.

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:

 **НОМОТЕК**

г. Москва, 119421

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

Тел.: +7 (968) 333 43 85

www.nomotech.ru

I0035