

ИНСТРУКЦИЯ

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ОНКОСКРИН 14-Q предназначен для выявления интенсивности экспрессии гена *ABL* человека методом ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan. Набор предназначен только для применения *in vitro*. Тест-система позволяет определять экспрессию *ABL* в образцах кДНК, полученных из образцов периферической крови, костного мозга и других тканей организма человека. Определение экспрессии *ABL* может применяться для вычисления относительной экспрессии патологически значимых генов в гематологии, онкологии и иммунологии, для оценки качества клинических образцов.

Набор ОНКОСКРИН 14-Q рассчитан на проведение 400 реакций ПЦР в реальном времени для анализа 100 клинических образцов в повторах, построения калибровочных кривых из 3 десятикратных разведений проб положительного контроля (14 серий по 2 повтора или 9 серий по 3 повтора), для постановки проб отрицательного контроля. Анализируемым материалом является комплементарная ДНК (кДНК). Воспроизводимая чувствительность набора составляет не более 10 копий гена *ABL* на реакцию, минимальная чувствительность составляет 1 копию гена *ABL* на реакцию.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Количественное определение экспрессии гена *ABL* основано на трех последовательных операциях: выделение тотальной РНК из клинических образцов по методу Хомчинского, проведение реакции обратной транскрипции с получением к-ДНК, проведение реакции амплификации в режиме реального времени, совмещенной с детекцией продуктов реакции. Число копий гена *ABL* в клинических образцах определяется по калибровочной кривой, которая строится по стандартам с известной концентрацией.

Внимание! Реактивы для выделения тотальной РНК и получения кДНК в состав набора ОНКОСКРИН 14-Q не входят. Для выделения РНК и получения к-ДНК рекомендуется использовать тест-системы RNA-экстракт-1 и RNA-экстракт-5.

СОСТАВ НАБОРА

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

Таблица 1

Название пробирки	Компонент	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Буфер	Буфер для ПЦР 2х	3	1700
Полимераза	ДНК-полимераза	1	100
Вода	Деионизованная вода	1	2000
Праймеры	Смесь праймеров <i>ABL</i> 10х	1	1000
Зонд	Зонд <i>ABL</i> 10х	1	1000
10 ⁴ /5, 10 ⁵ /5, 10 ⁶ /5	Положительный контроль, десятикратные разведения: 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ копий гена в 5 мкл	3	140

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Проведение анализа.

- Извлечь набор из холодильника, достать пробирки «Буфер», «Вода», «Праймеры», «Зонд», контроль: 3 десятикратных разведения «10⁴/5», «10⁵/5», «10⁶/5», и установить их в штатив. Убрать оставшиеся компоненты набора в холодильник. Выдержать компоненты набора при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 15-30 минут (с учётом полного размораживания). Все реагенты перед использованием тщательно перемешать, удалить со

стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 10 секунд при 1000 g.

- Рассчитать, какое количество пробирок/стрипов/лунок необходимо для постановки реакции с учетом клинических образцов, трех образцов десятикратных разведений положительного контроля и отрицательного контроля (не содержащего кДНК-матрицы) в повторах для каждого образца. Приготовить и промаркировать соответствующие пробирки/стрипы/луночки с учетом способа детекции используемого амплификатора.
- Извлечь набор из холодильника, достать пробирку «Полимераза» и установить её в штатив.
- Приготовить смесь для ПЦР в указанной ниже последовательности и количестве:

«Буфер»	12,5 мкл x (N+1)
«Праймеры»	2,5 мкл x (N+1)
«Зонд»	2,5 мкл x (N+1)
«Вода»	2,3 мкл x (N+1)
«Полимераза»	0,2 мкл x (N+1)

 Общий объём: 20 мкл x (N+1), где N - число реакций (пробирок, лунок).
- Полученную рабочую смесь для ПЦР тщательно перемешать, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 10 секунд при 1000 g.
- В пробирки/стрипы/луночки добавить по 20 мкл смеси для ПЦР. Добавить в соответствующие пробирки/луночки по 5 мкл анализируемой кДНК, контрольной ДНК (из пробирок положительного контроля: десятикратные разведения «10⁴/5», «10⁵/5», «10⁶/5»). В пробирки/луночки с отрицательным контролем добавить по 5 мкл деионизированной воды. Конечный реакционный объем каждого образца должен составить 25 мкл.
- Закрыть пробирки/стрипы, в случае использования плашек заклеить их полимерной пленкой.
- Поместить пробирки в ПЦР амплификатор и провести амплификацию в режиме реального времени (методом полимеразной цепной реакции) по следующей программе:

Таблица 2

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

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

Регистрация и учет результатов.

- По окончании амплификации в режиме реального времени для каждой пробы определяется значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает линию порога (Threshold) (Рис.1).
- По значениям стандартов (положительных контролей) с известной концентрацией строится калибровочная кривая, по которой, исходя из значения порогового цикла в каждой пробирке/луночке, определяется исходное число копий гена в каждом клиническом образце. Для более точного определения числа копий гена каждый клинический образец ставится в двух или трех повторах, для расчетов используется среднее значение числа копий. Построение калибровочной кривой и определение числа копий гена производится с помощью компьютерных программ, прилагаемых к амплификатору.
- При отсутствии флуоресцентного сигнала в образцах положительного контроля, а также при наличии флуоресцентного сигнала в образцах отрицательного контроля (не содержащих кДНК-матрицы) результаты реакции ПЦР в реальном времени признаются недействительными.

- Значение коэффициента детерминации (R^2) должно быть не ниже 0,98, а эффективность реакции в пределах 1,05-0,95 (95-105%).
- Для ряда ПЦР амплификаторов в реальном времени (например ABI Prizm 7500, фирма «Applied Biosystems») предполагается дополнительное использование пассивного референсного красителя при постановке ПЦР реакции. Референсный краситель в набор ОНКОСКРИН 14-Q не входит.

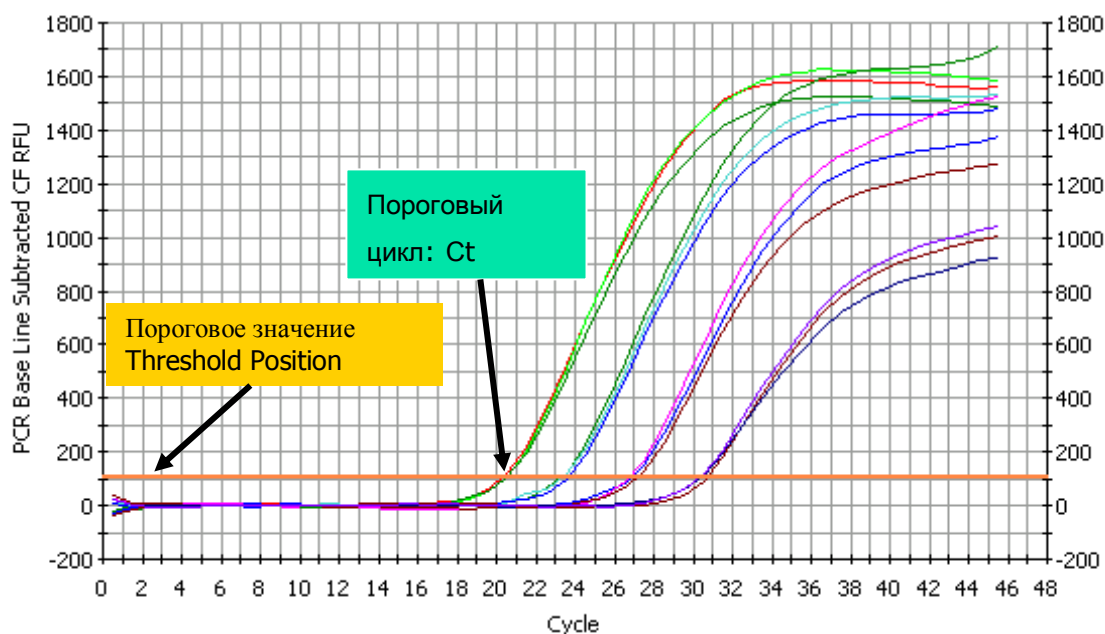


Рис.1 Параметры реакции ПЦР в реальном времени, учитываемые при расчете.

ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Транспортирование диагностического набора следует производить всеми видами крытого транспорта при температуре минус 20°C не более 2-х суток.

Срок годности набора - 6 месяцев со дня приемки набора отделом контроля качества предприятия-изготовителя.

Комплект реактивов для проведения ПЦР в реальном времени должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя, в морозильнике при температуре от минус 18°C до минус 22°C в течение всего срока эксплуатации тест-системы.

Компоненты набора рекомендуется замораживать/размораживать не более 3 раз. Исходя из этого, рекомендуется при первом использовании разделить реактивы на аликвоты, содержащие количество каждого компонента, необходимое для 2-3 реакций, и заморозить.

Положительные контроли желательно хранить при температуре минус 70°C, отдельно от остальных компонентов набора, повторно замораживать/размораживать не более 3 раз, размороженные аликвоты рекомендуется хранить при 4°C (максимальный срок 3 недели).

Пробирку «Зонд» нельзя длительное время подвергать действию прямого света.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

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