

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени для количественного выявления мутаций W515L/К гена *MPL* (MPLW515L/К-тест)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов MPLW515L/К-тест предназначен для количественного выявления мутаций W515L и W515K гена *MPL* методом ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan.

1.2. Набор предназначен только для применения *in vitro*.

1.3. Тест-система позволяет определять аллельную нагрузку мутантных форм W515L и W515K гена *MPL* в образцах ДНК, полученных из лейкоцитов периферической крови у больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями. Точечная мутация гена тромбопоэтинового рецептора *MPL*^{W515L,K} встречается у 5-10% больных эссенциальной тромбоцитемией и идиопатический миелофиброзом, отрицательных по мутации *JAK2*^{V617F}. Выявление мутаций W515L и W515K гена *MPL* и определение относительной концентрации мутантных форм W515L и W515K может применяться для дифференциальной диагностики, мониторинга минимальной остаточной болезни, оценки ответа на терапию.

1.4. Набор состоит из двух частей, каждая часть содержит реактивы для определения одной из мутаций W515L и W515K гена *MPL*. Каждая из двух частей набора рассчитана на проведение 850 реакций ПЦР в реальном времени для анализа 100 клинических образцов в повторах, построения калибровочных кривых из 3 десятикратных разведений проб положительного ДНК контроля с мутацией W515L или W515K гена *MPL* и 3 десятикратных разведений проб ДНК контроля нормы, и постановки пробы отрицательного контроля. Анализируемым материалом является ДНК.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

2.1. Принцип действия.

Количественное определение экспрессии мутантных форм W515L или W515K гена *MPL* основано на двух последовательных операциях: 1) выделение тотальной ДНК из клинических образцов; 2) проведение реакции амплификации в режиме реального времени, совмещенной с детекцией продуктов реакции.

Внимание! Реактивы для выделения тотальной ДНК в состав набора MPLW515L/K-тест не входят.

2.2. Состав набора.

В состав каждой из двух частей набора MPLW515L/K-тест входит по 17 пробирок различного объема, содержащих готовые к применению реагенты:

Таблица 1

Часть 1. Мутация W515L гена *MPL*.

Название пробирки	Компонент	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Буфер	Буфер для ПЦР 2х	Пластиковые пробирки вместимостью 2 мл с фиолетовой крышкой	6	1800
Полимераза	ДНК-полимераза	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с прозрачной крышкой	1	180
Деионизованная вода	Деионизованная вода	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с прозрачной крышкой	2	2000
Праймеры и зонд <i>MPL</i> W515L	Смесь праймеров и зонда <i>MPL</i> W515L 10х	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с красной крышкой	1	1100
Праймеры и зонд норма	Смесь праймеров и зонда для анализа нормы 10х	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с зеленой крышкой	1	1100
W515L 10 ⁴ /5, W515L 10 ⁵ /5, W515L 10 ⁶ /5	Положительный контроль (W515L), десятикратные разведения: 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ копий гена в 5 мкл	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с оранжевой крышкой	3	160
норма 10 ⁴ /5, норма 10 ⁵ /5, норма 10 ⁶ /5	Положительный контроль (норма), десятикратные разведения: 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ копий гена в 5 мкл	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с синей крышкой	3	160

Таблица 1

Часть 2. Мутация W515K гена *MPL*.

Название пробирки	Компонент	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Буфер	Буфер для ПЦР 2х	Пластиковые пробирки вместимостью 2 мл с фиолетовой крышкой	6	1800
Полимераза	ДНК-полимераза	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с прозрачной крышкой	1	180
Деионизованная вода	Деионизованная вода	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с прозрачной крышкой	2	2000
Праймеры и зонд <i>MPL</i> W515K	Смесь праймеров и зонда <i>MPL</i> W515K 10х	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с красной крышкой	1	1100
Праймеры и зонд норма	Смесь праймеров и зонда для анализа нормы 10х	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с зеленой крышкой	1	1100
W515K 10 ⁴ /5, W515K 10 ⁵ /5, W515K 10 ⁶ /5	Положительный контроль (W515K), десятикратные разведения: 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ копий гена в 5 мкл	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с оранжевой крышкой	3	160
норма 10 ⁴ /5, норма 10 ⁵ /5, норма 10 ⁶ /5	Положительный контроль (норма), десятикратные разведения: 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ копий гена в 5 мкл	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с синей крышкой	3	160

2.3. Воспроизводимая чувствительность набора составляет 5% относительных мутантных форм W515L или W515K гена *MPL* в клиническом образце.

2.4. Аналитическая специфичность: данная тест-система в режиме реального времени выявляет флуоресцентные сигналы, указывающие на наличие в анализируемом образце геномной ДНК человека мутантного W515K варианта гена *MPL* и/или нормального аллеля/аллелей. В образцах, не несущих мутацию W515K в гене *MPL*, результат исследования должен быть отрицательным.

2.5. Коэффициент вариации результатов определений – не более 10%.

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ:

- ПЦР бокс;
- прибор для ПЦР в реальном времени («ПЦР-амплификатор»), имеющий канал флуоресцентной детекции JOE/HEX (поглощение 515-545 нм, флуоресценция 560-585 нм), с компьютером и установленной на нем программой, анализирующей ПЦР;
- микроцентрифуга/вортекс;
- пробирки пластиковые вместимостью 0,5 или 1,5 мл (типа Эппендорф);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: 0,5-10 мкл, 5-50 мкл и 20-200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штативы для пробирок на 0,5мл, 1,5 мл и 2,0 мл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 1-10 мкл; 1-100 мкл; 1-200 мкл;
- 96-луночные или 48-луночные планшеты из оптически прозрачного бесцветного пластика или пробирки пластиковые объемом 0,2 мл из оптически прозрачного бесцветного пластика, совместимые с ПЦР-амплификатором;
- пленка полимерная оптически прозрачная для ПЦР плашек;
- холодильник фармацевтический или бытовой с морозильной камерой, температура морозильной камеры не выше -18°C;
- перчатки медицинские без талька.

4. Анализируемые образцы.

Анализируемым материалом является ДНК, полученная из лейкоцитов периферической крови клинических образцов. На результат исследования могут влиять большой срок хранения образцов ДНК или наличие в них интерферирующих веществ. Для получения достоверных результатов рекомендуется использование образцов ДНК с чистотой $A_{260/280}=1,8\pm 0,1$ и с концентрацией в диапазоне 10-100 нг/мкл.

5. ПОРЯДОК РАБОТЫ

5.1. Проведение анализа.

5.1.1. Извлечь набор из морозильника, достать пробирки «Буфер», «Вода», «Смесь праймеров и зонда *MPL W515L*», «Смесь праймеров и зонда *MPL W515K*», «Смесь

праймеров и зонда норма», контроли: десятикратные разведения «W515L 10⁴/5», «W515L 10⁵/5», «W515L 10⁶/5» и «норма 10⁴/5», «норма 10⁵/5», «норма 10⁶/5» либо «W515K 10⁴/5», «W515K 10⁵/5», «W515K 10⁶/5» и «норма 10⁴/5», «норма 10⁵/5», «норма 10⁶/5», и установить их в штатив. Убрать оставшиеся компоненты набора в морозильник. Выдержать компоненты набора при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 15-30 минут (до 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.

5.1.2. Рассчитать необходимое количество пробирок/стрипов/лунок для постановки реакций для определения мутаций W515L или W515K гена *MPL* и для определения нормальной формы гена *MPL*. Определение мутации и нормы для каждого клинического образца проводят в отдельных пробирках/лунках в одной ПЦР-реакции. Расчет для мутации и для нормы составляют с учетом клинических образцов, трех образцов десятикратных разведений положительного контроля и отрицательного контроля (не содержащего ДНК матрицы) в повторах для каждого образца. Приготовить и промаркировать соответствующие пробирки/стрипы/лунки с учетом способа детекции используемого амплификатора.

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

5.1.4. Компоненты набора готовы к использованию.

5.1.5. Для определения каждой из мутаций приготовить пробирки для двух ПЦР-смесей. Приготовить смеси для ПЦР в указанной ниже последовательности и количестве:

1. ПЦР-смесь для анализа мутации

«Буфер»	12,5 мкл x (N+1)
«Смесь праймеров и зонда мутация»	2,5 мкл x (N+1)
«Вода»	4,8 мкл x (N+1)
«Полимераза»	0,2 мкл x (N+1)

2. ПЦР-смесь для анализа нормы

«Буфер»	12,5 мкл x (N+1)
«Смесь праймеров и зонда норма»	2,5 мкл x (N+1)
«Вода»	4,8 мкл x (N+1)
«Полимераза»	0,2 мкл x (N+1)

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

5.1.6. Полученную по п. 7.1.5. рабочую смесь для ПЦР тщательно перемешать, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 10 секунд при 1000 g.

5.1.7. В пробирки/стрипы/лунки, приготовленные согласно п. 7.1.2, добавить по 20 мкл смеси для ПЦР – смеси для анализа нормы и для анализа мутации добавляются в отдельные пробирки/лунки. В лунки для анализа нормы внести по 5 мкл анализируемой ДНК, положительного контроля нормы (из пробирок десятикратных разведений «норма 10⁴/5», «норма 10⁵/5», «норма 10⁶/5») и отрицательного контроля. В лунки для анализа мутации внести по 5 мкл анализируемой ДНК, положительного контроля W515L или W515K (из пробирок десятикратных разведений «W515L 10⁴/5» или «W515K 10⁴/5», «W515L 10⁵/5» или «W515K 10⁵/5», «W515L 10⁶/5» или «W515K 10⁶/5») и отрицательного контроля. В пробирки/лунки с отрицательным контролем добавить по 5 мкл деионизованной воды. Конечный реакционный объем каждого образца должен составить 25 мкл.

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

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

Таблица 2

Температура	Время	Количество циклов	Регистрация флуоресценции
94 °С	10 мин	1	нет
94 °С	10 сек	45	нет
60 °С	20 сек		нет
67 °С	10 сек		есть, канал R6G (Yellow)

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

5.2. Регистрация и учет результатов.

5.2.1. Для построения калибровочной кривой нужно использовать двукратные или трехкратные повторы разведений положительного контроля, концентрация которых составляет 10⁴, 10⁵ и 10⁶ копий в 5 мкл для одной из мутантных форм гена *MPL* и 10⁴, 10⁵ и 10⁶ копий в 5 мкл для нормальной формы гена *MPL*.

5.2.2. По окончании ПЦР-амплификации в режиме реального времени для каждой пробы в реакциях по анализу нормы и мутации определяется значение порогового цикла (Ct) –

цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает линию порога (Threshold) (Рис.1).

5.2.3. По значениям стандартов (положительных контролей) с известной концентрацией строятся калибровочные кривые для нормы и для мутации W515L или W515K, по которым, исходя из значения порогового цикла в каждой пробирке/лунке, определяется исходное число копий нормального гена *MPL* и гена с мутацией W515L или W515K соответственно 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 ($Q_{\text{мутация ср.}}$ и $Q_{\text{норма ср.}}$). Построение калибровочных кривых и определение числа копий гена производится с помощью компьютерных программ, прилагаемых к ПЦР амплификатору.

5.2.4. Относительная концентрация в образце мутантной формы W515L или W515K гена *MPL* рассчитывается по формуле:

$$Q_{\text{мутация ср.}} / (Q_{\text{мутация ср.}} + Q_{\text{норма ср.}}) * 100\%$$

5.2.5. При отсутствии флуоресцентного сигнала в образцах положительного контроля, а также при наличии флуоресцентного сигнала в образцах отрицательного контроля (не содержащих ДНК-матрицы) результаты реакции ПЦР в реальном времени признаются недействительными. Наличие флуоресцентного сигнала (детектируемое значение C_t) в пробах отрицательных контролей свидетельствует о контаминации. Необходимо переставить реакцию ПЦР в реальном времени. При этом желательно взять ранее не использованные реактивы и предпринять меры к устранению контаминации.

5.2.6. Значение коэффициента детерминации (R^2) должно быть не ниже 0,98, а эффективность реакции в пределах 1,05-0,95 (95-105%).

5.2.7. При расчете нужно учитывать следующее:

5.2.8.1. Линия порога устанавливается в начале линейной фазы флуоресценции. Для адекватного сравнения результатов, полученных в разных экспериментах, линия порога должна всегда иметь одинаковое значение и значения C_t для одинаковых стандартов не должны отличаться не более чем на 1 цикл. В реакциях для анализа нормы и для анализа мутации значения линии порога и C_t стандартов могут различаться.

5.2.8.2. Значение стандартного отклонения для порогового цикла для каждой анализируемой пробы не должно превышать 0,5 в повторах. В случае превышения данного значения стандартного отклонения результат реакции для анализируемого образца признается недействительным, и реакцию ПЦР для этого образца необходимо переставить. Допустимо исключение из расчета среднего числа копий гена значений для одного из трех повторов анализируемого образца, в случае, если значение C_t для него значительно

отличается от значений C_t для двух других повторов и значения C_t для этих двух оставшихся повторов близки (стандартное отклонение не выше 0,5).

5.2.8.3. Определение нормальной и мутантной форм гена *MPL* для данного клинического образца желательно проводить в одной ПЦР реакции, поскольку различия в прохождении двух независимых ПЦР реакций могут внести ошибку в вычисление относительной концентрации мутантной формы.

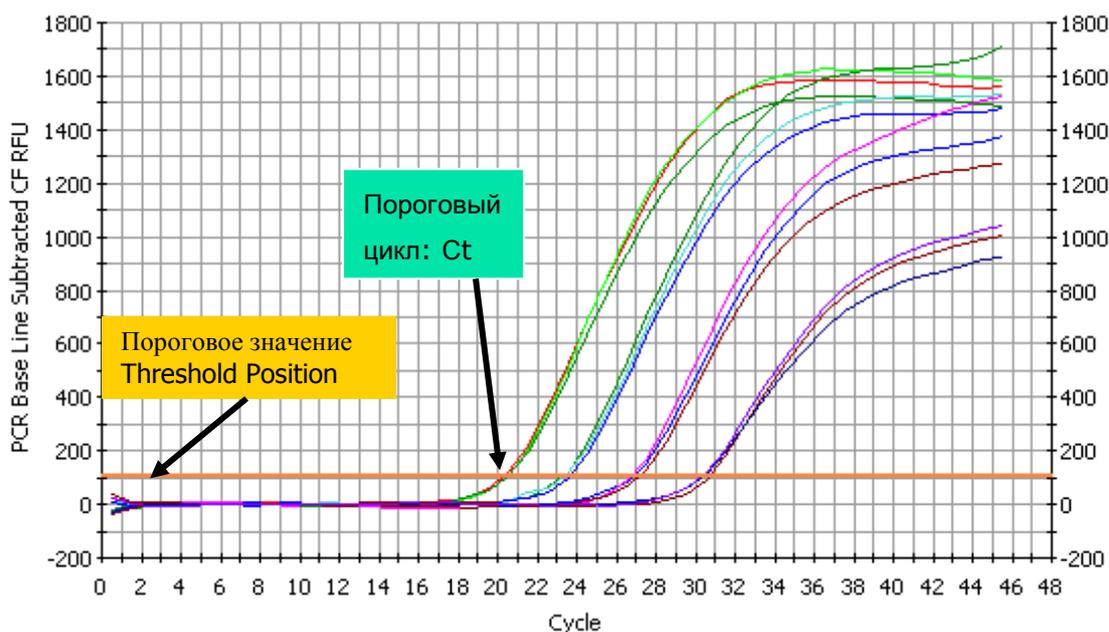


Рис.1 Параметры реакции ПЦР в реальном времени, учитываемые при расчете.

6. ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

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

6.2. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

6.3. Срок годности набора - 12 месяцев со дня приемки набора отделом контроля качества предприятия-изготовителя.

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

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

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

6.7. Пробирки «Смесь праймеров и зонда» нельзя длительное время подвергать действию прямого света.

6.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

7. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

7.1. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

По вопросам качества набора MPLW515L/К-тест следует обращаться в ООО «ГеноТехнология» по адресу: 117485, Москва, ул. Профсоюзная, д. 104, тел. (499)530-01-95, e-mail: info@genetechnology.ru, www.genetechnology.ru.