

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления экспрессии химерного онкогена человека *BCR-ABL* типов b3a2 и b2a2 p210 методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (ОНКОСКРИН 1-1)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ОНКОСКРИН 1-1 предназначен для выявления экспрессии химерного онкогена человека *BCR-ABL* типов b3a2 и b2a2 p210 методом ПЦР с использованием праймеров, комплементарных области слияния *BCR* и *ABL* последовательностей в составе химерной мРНК *BCR-ABL*. Тест-система позволяет определять экспрессию *BCR-ABL* типов b3a2 и b2a2 в образцах комплементарной ДНК (кДНК). Образцы кДНК предварительно получают из периферической крови или костного мозга больных ХМЛ с помощью выделения тотальной РНК и получения кДНК способом обратной транскрипции. Реактивы для выделения тотальной РНК и получения кДНК в состав набора ОНКОСКРИН 1-1 не входят. Выявление экспрессии химерного онкогена человека *BCR-ABL* типа p210 может применяться для дифференциальной диагностики, мониторинга минимальной остаточной болезни, оценки ответа на терапию.

Набор предназначен только для применения *in vitro*. Область применения – генетика, клиническая лабораторная диагностика.

Набор рассчитан на проведение 375 реакций ПЦР для анализа 100 образцов кДНК, проб двух положительных контролей и отрицательного контроля на наличие мРНК *BCR-ABL* типов b3a2 и b2a2 p210.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора ОНКОСКРИН 1-1 входит 16 пробирок различного объема, содержащих готовые к применению реагенты:

Компонент	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Реакционная смесь «ПЦР1 <i>BCR-ABL</i> p210 10х»	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с желтой крышкой	1	320
Реакционная смесь «ПЦР2 <i>BCR-ABL</i> p210 10х»	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с красной крышкой	1	320
Реакционная смесь «ПЦР <i>ABL</i> 10х»	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с зеленой крышкой	1	320
ДНК-полимераза	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с прозрачной крышкой	1	80
Деионизованная вода	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с прозрачной крышкой	4	2000
Минеральное масло	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с фиолетовой крышкой	4	2000
Положительный контроль « <i>BCR-ABL</i> b3a2 p210»	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с оранжевой крышкой	1	100
Положительный контроль « <i>BCR-ABL</i> b2a2 p210»	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с оранжевой крышкой	1	100
Положительный контроль « <i>ABL</i> »	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с синей крышкой	1	100
Буфер для нанесения на электрофорез	Пластиковые пробирки вместимостью 2 мл с фиолетовой крышкой	1	750

Пробирки с компонентами набора установлены в пластиковый или картонный штатив. Штатив с компонентами набора помещен в картонную коробку. Коробка и инструкция по применению помещены в герметично закрывающийся прозрачный пакет из полипропилена.

Аналитическая чувствительность набора составляет не более 1-3 копий/мкл гена *BCR-ABL* типа p210.

Аналитическая специфичность: Данная тест-система выявляет в положительных образцах *BCR-ABL* типа p210 фрагменты кДНК, которые имеют строго определенный размер и электрофоретическую подвижность. В отрицательных образцах такие фрагменты отсутствуют.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- ПЦР-бокс;
- ПЦР амплификатор;
- микроцентрифуга/вортекс;
- пробирки пластиковые вместимостью 0,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: 0,5-10 мкл, 5-50 мкл и 20-200 мкл;
- штативы для пробирок 0,5 мл «рабочее место»;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 1-10 мкл; 1-100 мкл; 1-200 мкл;
- система для электрофоретической детекции;
- холодильник фармацевтический типа Sanyo MPR-414F или бытовой с морозильной камерой;
- перчатки медицинские.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

1 стадия (ПЦР1):

- Извлечь набор из холодильника, достать пробирки «ПЦР1 *BCR-ABL* p210 10х», «Деионизованная вода», «Минеральное масло» и положительные контроли «*BCR-ABL* b3a2 p210» и «*BCR-ABL* b2a2 p210», и установить их в штатив. 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 в течение 10 секунд при 1000 g. Извлечь из холодильника пробирку «ДНК-полимераза» и установить её в штатив.
- Рассчитать необходимое количество пробирок для постановки реакций для определения *BCR-ABL* типов b3a2 и b2a2 с учетом клинических образцов кДНК, двух положительных и одного отрицательного контроля (деионизованная вода). Приготовить и промаркировать соответствующие пробирки.
- В пробирки для амплификации вносят по 2,5 мкл реакционной смеси «ПЦР1 *BCR-ABL* p210 10х», 20,3 мкл деионизованной воды и 0,2 мкл ДНК-полимеразы. В качестве матрицы используют по 2 мкл анализируемой кДНК, либо 2 мкл положительного «*BCR-ABL* b3a2 p210» или «*BCR-ABL* b2a2 p210», или отрицательного контроля (деионизованной воды). Набор ОНКОСКРИН-1-1 предусматривает постановку двух положительных и одного отрицательного контролей (деионизованной воды) на один клинический образец. Если возможности исследования допускают постановку двух положительных и одного отрицательного контролей (деионизованной воды) на большее число клинических образцов – общее количество исследуемых клинических образцов возрастает.
- Полученные смеси для ПЦР тщательно перемешать. Внести в пробирки по 15 мкл минерального масла, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 10 секунд при 1000 g.
- Поместить пробирки в ПЦР амплификатор и провести амплификацию по следующей программе:

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1
95 °С	20 сек	30
65 °С	20 сек	
72 °С	1,5 мин	
72 °С	5 мин	1

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

2 стадия (ПЦР2):

- Извлечь набор из холодильника, достать пробирки «ПЦР2 *BCR-ABL* p210 10х», «Деионизованная вода», «Минеральное масло», и установить их в штатив. Выдержать компоненты набора при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) 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 в течение 10 секунд при 1000 г. Извлечь из холодильника пробирку «ДНК-полимераза» и установить её в штатив.
- Приготовить и промаркировать пробирки для постановки второй стадии реакции.
- В пробирки для амплификации вносят по 2,5 мкл реакционной смеси «ПЦР2 *BCR-ABL* p210 10х», 20,3 мкл деионизованной воды и 0,2 мкл ДНК-полимеразы. В качестве матрицы используют по 2 мкл реакционной смеси, полученной после проведения ПЦР1.
- Полученные смеси для ПЦР тщательно перемешать. Внести в пробирки по 15 мкл минерального масла, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) в течение 10 секунд при 1000 г.
- Поместить пробирки в ПЦР амплификатор и провести амплификацию по следующей программе:

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1
95 °С	20 сек	30
65 °С	20 сек	
72 °С	1,5 мин	
72 °С	5 мин	1

ПЦР «ABL»:

- Извлечь набор из холодильника, достать пробирки «ПЦР *ABL* 10х», «Деионизованная вода», «Минеральное масло», положительный контроль «*ABL*», и установить их в штатив. Выдержать компоненты набора при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) 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 в течение 10 секунд при 1000 г. Извлечь из холодильника пробирку «ДНК-полимераза» и установить её в штатив.
- Приготовить и промаркировать пробирки для постановки второй стадии реакции.
- В пробирки для амплификации вносят по 2,5 мкл реакционной смеси «ПЦР *ABL* 10х», 20,3 мкл деионизованной воды и 0,2 мкл ДНК-полимеразы. В качестве матрицы используют по 2 мкл

анализируемой кДНК, либо 2 мкл положительного «ABL» или отрицательного контроля (деионизованной воды).

- Полученные смеси для ПЦР тщательно перемешать. Внести в пробирки по 15 мкл минерального масла, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 10 секунд при 1000 g.
- Поместить пробирки в ПЦР амплификатор и провести амплификацию по следующей программе:

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1
95 °С	20 сек	30
62 °С	20 сек	
72 °С	1,5 мин	
72 °С	5 мин	1

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрация результатов производится при помощи электрофоретического разделения продуктов ПЦР2 и ПЦР «ABL» в 1,5% агарозном геле или в 6% полиакриламидном геле. Для проведения электрофореза берут 10 мкл реакционной смеси, полученной после ПЦР2 или ПЦР «ABL» и смешивают с 2 мкл буфера для нанесения на электрофорез. Разделение проводят до приближения полосы темно-синего красителя к нижнему краю геля. Типу экспрессии **b3a2** гена **BCR-ABL** соответствует фрагмент длиной **360 пн**, а типу **b2a2** - фрагмент длиной **285 пн**. Гену **ABL** соответствует фрагмент длиной **374 пн**. Вторая полоса большего размера, которая иногда получается на электрофорезе реакционной смеси на ABL, является результатом ПЦР-амплификации незначительной примеси геномной ДНК в выделенной РНК. При избытке генетического материала в образце полоса нужного фрагмента может получиться слишком широкой или двойной. В этом случае необходимо развести кДНК в 2-2,5 раза и/или взять по 1 мкл матрицы на каждый раунд ПЦР и вновь провести ПЦР-реакцию.

Данная тест-система выявляет в положительных образцах **BCR-ABL** фрагменты ДНК, которые имеют строго определенный размер и электрофоретическую подвижность. В отрицательных образцах такие фрагменты отсутствуют. Во всех образцах иногда может наблюдаться незначительная примесь фрагментов другой электрофоретической подвижности. Такие фрагменты являются неспецифическими и диагностического значения не имеют. Их присутствие определяется качеством обработки проб и особенностями применяемых в конкретной лаборатории ПЦР-амплификаторов.

ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

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

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

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

Комплект реактивов для проведения ПЦР 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.

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).

Минеральное масло и буфер для нанесения на электрофорез могут храниться при комнатной температуре.

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. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора Онкоскрин-1-1 следует обращаться в ООО «ГеноТехнология» по адресу: 117485, Москва, ул. Профсоюзная, д. 104, тел. (499)530-01-95, (499)530-02-58, e-mail: info@genetechnology.ru, www.genetechnology.ru.