

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления экспрессии химерного онкогена человека *TEL-AML1* продукта транслокации t(12;21) методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (ОНКОСКРИН-8)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ОНКОСКРИН-8 предназначен для выявления экспрессии химерного онкогена человека *TEL-AML1* методом ПЦР с использованием праймеров, комплементарных области слияния *TEL* и *AML1* последовательностей в составе химерной мРНК *TEL-AML1*. Тест-система позволяет определять экспрессию *TEL-AML1* в образцах комплементарной ДНК (кДНК). Образцы кДНК предварительно получают из периферической крови или костного мозга больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) с помощью выделения тотальной РНК и получения кДНК способом обратной транскрипции. Реактивы для выделения тотальной РНК и получения кДНК в состав набора ОНКОСКРИН-8 не входят. Выявление экспрессии химерного онкогена человека *TEL-AML1* 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 положительного контроля и отрицательного контроля на наличие мРНК *TEL-AML1*.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора ОНКОСКРИН-8 входит 15 пробирок различного объема, содержащих готовые к применению реагенты:

Компонент	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Реакционная смесь «ПЦР1 <i>TEL-AML1</i> 10х»	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с желтой крышкой	1	320
Реакционная смесь «ПЦР2 <i>TEL-AML1</i> 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>TEL-AML1</i> »	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 *TEL-AML1*.
 Аналитическая специфичность: Данная тест-система выявляет в положительных образцах *TEL-AML1* 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 объёмом 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 *TEL-AML1* 10х», «Деионизованная вода», «Минеральное масло» и положительный контроль «*TEL-AML1*», 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 *TEL-AML1* с учетом клинических образцов кДНК, положительного и отрицательного контроля (деионизованная вода). Приготовить и промаркировать соответствующие пробирки.
- В пробирки для амплификации вносят по 2,5 мкл реакционной смеси «ПЦР1 *TEL-AML1* 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 «*TEL-AML1*» или отрицательного контроля (деионизованной воды). Набор ОНКОСКРИН-8 предусматривает постановку одного положительного и одного отрицательного контроля (деионизованной воды) на один клинический образец. Если возможности исследования допускают постановку одного положительного 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 *TEL-AML1* 10х», «Деионизованная вода», «Минеральное масло», 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.
- Приготовить и промаркировать пробирки для постановки второй стадии реакции.
- В пробирки для амплификации вносят по 2,5 мкл реакционной смеси «ПЦР2 *TEL-AML1* 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°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

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°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.
- 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 специального буфера для нанесения на электрофорез. Разделение проводят до приближения полосы темно-синего красителя к нижнему краю геля. Гену *TEL-AML1* в большинстве случаев соответствует фрагмент длиной **281 пн** (ту же длину имеет положительный контроль), изредка встречается вариант длиной **242 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 *TEL-AML1* 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°С 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°С до минус 22°С в течение всего срока эксплуатации тест-системы.

Положительные контроли желательно хранить при температуре минус 70°С, отдельно от остальных компонентов набора, повторно замораживать/размораживать не более 3 раз, размороженные аликвоты рекомендуется хранить при 4°С (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-8 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.