

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени для количественного выявления мутации V617F в 14 экзоне гена *JAK2* киназы (Jak2V617F-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов Jak2V617F-тест предназначен для количественного выявления мутации V617F в 14 экзоне гена *JAK2* киназы методом ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan. Набор предназначен только для применения *in vitro*. Тест-система позволяет определять экспрессию мутантной формы V617F гена *JAK2* киназы в образцах ДНК, полученных из лейкоцитов периферической крови человека. Выявление мутации V617F гена *JAK2* и определение относительной концентрации мутантной V617F формы может применяться для дифференциальной диагностики, мониторинга минимальной остаточной болезни, оценки ответа на терапию.

Набор рассчитан 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 V617F в гене *JAK2* и 3 десятикратных разведений проб ДНК контроля нормы (10 серий по 3 повтора каждый), для постановки проб отрицательного контроля. Анализируемым материалом является ДНК. Воспроизводимая чувствительность набора составляет не более 5% относительной концентрации мутантной формы V617F гена *JAK2* киназы в клиническом образце.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Количественное определение экспрессии мутантной формы V617F гена *JAK2* киназы основано на двух последовательных операциях: выделение тотальной ДНК из клинических образцов, проведение реакции амплификации в режиме реального времени, совмещенной с детекцией продуктов реакции. По калибровочным кривым, которые строятся по стандартам с известной концентрацией, определяется число копий мутантной V617F формы и нормальной формы гена *JAK2* киназы в клинических образцах, и на основании этого вычисляется относительная концентрация мутантной V617F формы гена *JAK2*.

Внимание! Реактивы для выделения тотальной ДНК в состав набора Jak2V617F-тест не входят. Для выделения ДНК рекомендуется использовать тест-систему DNA-экстракт.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора Jak2V617F-тест входит 19 пробирок различного объема, содержащих готовые к применению реагенты:

Таблица 1

Название пробирки	Компонент	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Буфер	Буфер для ПЦР 2х	6	1800
Полимераза	ДНК-полимераза	1	180
Вода	Деионизованная вода	2	1100
Праймеры	Смесь праймеров <i>JAK2</i> V617F 10х	2	1100
Зонд V617F	Зонд для анализа мутации <i>JAK2</i> V617F 10х	1	1100
Зонд норма	Зонд для анализа нормы <i>JAK2</i> 10х	1	1100
V617F 10 ⁴ /5, V617F 10 ⁵ /5, V617F 10 ⁶ /5	Положительный контроль (V617F), десятикратные разведения: 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ копий гена в 5 мкл	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	3	160

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Проведение анализа.

- Извлечь набор из холодильника, достать пробирки «Буфер», «Вода», «Праймеры», «Зонд V617F» и «Зонд норма», контроли: 6 десятикратных разведений «V617F 10⁴/5», «V617F 10⁵/5», «V617F 10⁶/5» и «норма 10⁴/5», «норма 10⁵/5», «норма 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 необходимое количество пробирок/стрипов/лунок для постановки реакций для определения мутации V617F и для определения нормальной формы гена JAK2. 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/лунок с учетом способа детекции используемого амплификатора.
- Извлечь оставшиеся компоненты набора из холодильника, достать пробирку «Полимераза» и установить её в штатив.
- 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)
«Праймеры»	2,5 мкл x (N+1)
«Зонд V617F»	2,5 мкл x (N+1)
«Вода»	2,3 мкл x (N+1)
«Полимераза»	0,2 мкл x (N+1)
 2. ПЦР-смесь для анализа нормы

«Буфер»	12,5 мкл x (N+1)
«Праймеры»	2,5 мкл x (N+1)
«Зонд норма»	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/лунок добавить по 20 мкл смеси для ПЦР – смеси для анализа нормы и для анализа мутации добавляются в отдельные пробирки/лунок. 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 V617F (из пробирок десятикратных разведений «V617F 10⁴/5», «V617F 10⁵/5», «V617F 10⁶/5») и отрицательного контроля. В пробирки/лунок с отрицательным контролем добавить по 5 мкл деионизованной 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	20 сек	40	нет
54 °C	30 сек		нет
60 °C	60 сек		есть, канал R6G (Yellow)

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

Регистрация и учет результатов.

- 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).
- По значениям стандартов (положительных контролей) с известной концентрацией строятся калибровочные кривые для нормы и для мутации V617F, по которым, исходя из значения порогового цикла в каждой пробирке/лунке, определяется исходное число копий нормального гена *JAK2* и гена с мутацией V617F 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 (Qмутация ср. и Qнорма ср.). Построение калибровочных кривых и определение числа копий гена производится с помощью компьютерных программ, прилагаемых к ПЦР амплификатору.
- Относительная концентрация в образце мутантной формы V617F гена *JAK2* рассчитывается по формуле:

$$Q_{\text{мутация ср.}} / (Q_{\text{мутация ср.}} + Q_{\text{норма ср.}}) * 100\%$$
- 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.
- 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 ABIPrizm 7500, фирма «Applied Biosystems») предполагается дополнительное использование пассивного референсного красителя при постановке ПЦР реакции. Референсный краситель в набор Jak2V617F-тест не входит.

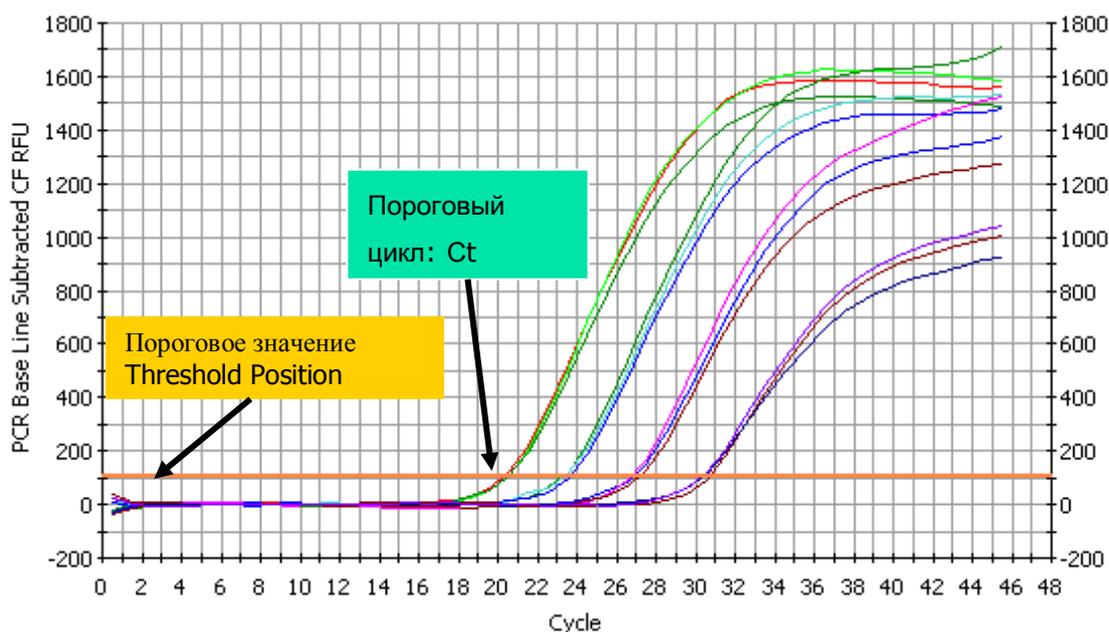


Рис.1 Параметры реакции ПЦР в реальном времени, учитываемые при расчете.

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).

Пробирки «Зонд V617F» и «Зонд норма» нельзя длительное время подвергать действию прямого света.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора Jak2V617F-тест 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.