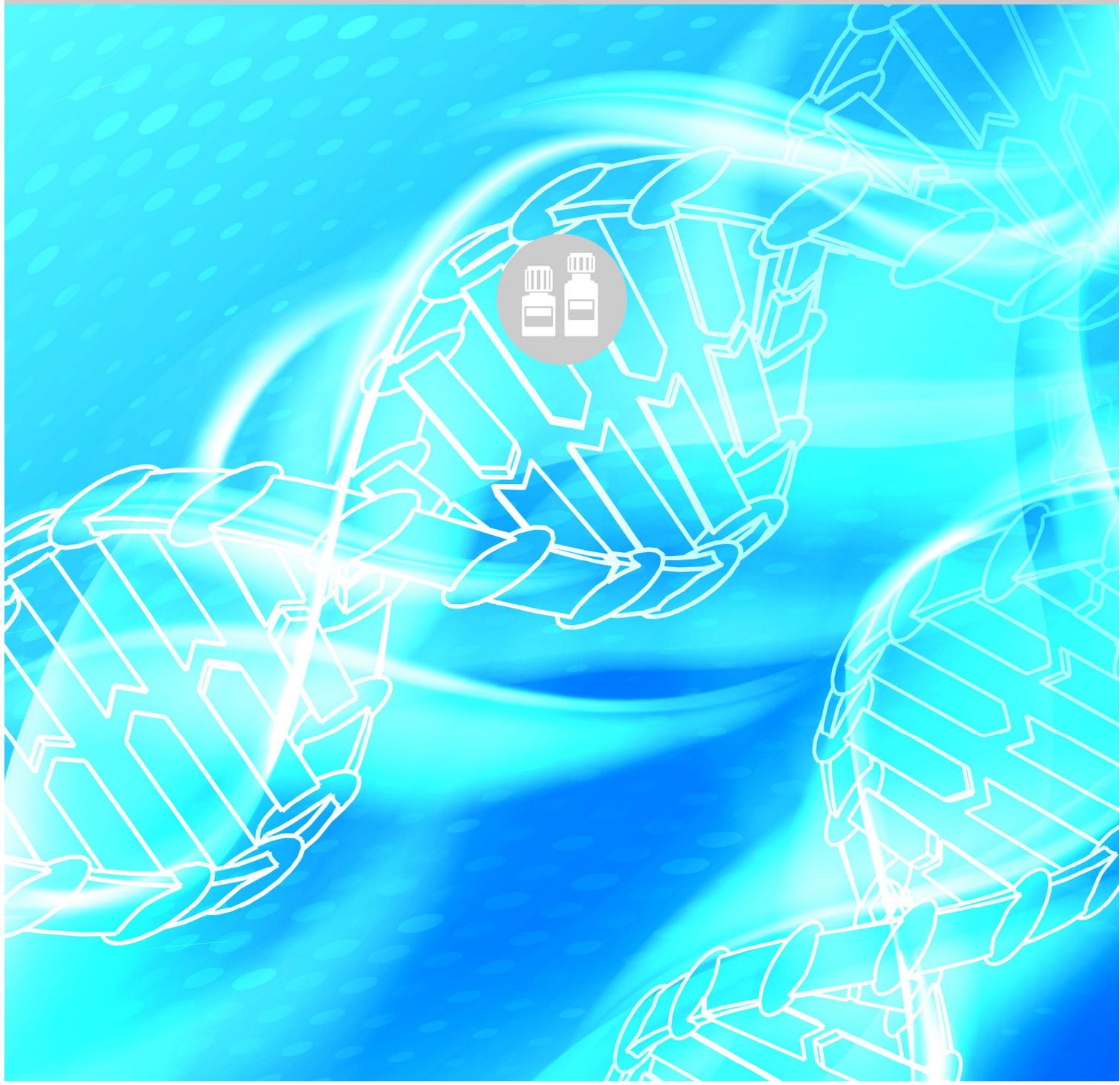


НАБОРЫ РЕАКТИВОВ

для молекулярно-генетической
диагностики





Уважаемые коллеги!

Перед Вами — каталог молекулярно-диагностических тестов для онкологии, использование которых поможет врачу решить целый ряд принципиально новых для клинической практики вопросов, а во многих случаях — продлить жизнь онкологическому больному.

Молекулярно-генетические тесты в онкологии позволяют решать по крайней мере 3 группы вопросов:

- выявлять наследственную предрасположенность к онкологическим заболеваниям;
- проводить эффективную терапию таргетными препаратами с учетом молекулярно-генетических характеристик опухоли;
- избегать генетически обусловленной токсичности препарата.

Возможность выявлять **наследственную предрасположенность** к раку молочной железы и раку яичников появилась сравнительно недавно. На сегодняшний день медицина не может предотвратить генетически обусловленные онкологические заболевания, однако, зная высокую степень предрасположенности к возникновению злокачественной опухоли, вполне возможно сделать все для обнаружения опухоли на самых ранних этапах ее развития у генетически отягощенного пациента для того, чтобы удаление опухоли было максимально эффективным и щадящим.

Препараты последнего поколения — т.н. **таргетные препараты** при лечении онкологических заболеваний направлены на конкретную молекулярную мишень. Эффективность использования таких препаратов часто зависит от структурных особенностей мишени или от особенностей окружающих мишень молекул. Проведение корректного молекулярно-генетического анализа опухоли перед использованием таргетного препарата во многих случаях позволяет продлить жизнь пациента на несколько лет. Так, использование **Тарцевы (Эрлотиниба)** и **Ирессы (Гефитиниба)** при немелкоклеточном раке легкого обосновано (и крайне эффективно!) только для пациентов, у которых в клетках опухоли есть специфические изменения гена эпидермального фактора роста (*EGFR*) и нет активирующих мутаций в гене *KRAS*. Использование препаратов Вектибикс и Эрбитукс обосновано (и эффективно!) при раке толстой кишки только при условии отсутствия активирующих мутаций в гене *KRAS* — необходимость такого анализа указана даже в вкладышах к препаратам.

Молекулярно-генетический анализ необходим и при использовании традиционной химиотерапии.

Так, недорогая и быстрая процедура анализа наиболее распространенной мутации в гене *DYPD* перед использованием 5-фторурацила или комбинаций, его содержащих, позволяет избежать значительной части острых токсических реакций на этот препарат.

Использование молекулярно-генетических технологий в практической онкологии в России только начинается. Надеемся, что предлагаемый Лабораторией генодиагностики ООО «БиоЛинк» спектр аналитических процедур и продуктов будет содействовать более эффективному становлению молекулярно-генетического анализа при онкологических заболеваниях в России, и, как следствие, улучшению качества медицинской помощи онкологическим больным.



Содержание

2 Наборы реактивов для детекции мутаций, связанных с наследственными формами рака:

- Наборы реактивов для выявления мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK2*
- Принцип действия наборов реактивов

6 Наборы реактивов для детекции соматических мутаций:

- Наборы реактивов для выявления мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*
- Принцип действия наборов реактивов Real-time-PCR-KRAS-7M, Real-time-PCR-BRAF-V600E, Real-time-PCR-EGFR-2M, Real-time-PCR-EGFR-7R
- Наборы реактивов для выявления мутации G735A в гене *DPYD* методом ПЦР в режиме реального времени
- Принцип действия набора реактивов Real-Time PCR *DPYD-G735A*
- Наборы реактивов для относительного определения дозы гена *HER2/neu* в геномной ДНК человека
- Принцип действия набора реактивов Real-Time PCR *HER2/neu*

16 Наборы реактивов для избирательного обогащения ампликонов ДНК

19 Наборы реактивов для выделения ДНК:

- из срезов тканей, залитых в парафиновые блоки
- на магнитных частицах из срезов тканей, залитых в парафиновые блоки
- из цельной крови



Наборы реактивов для детекции мутаций, связанных с наследственными формами рака

- Выявление мутации BRCA1 5382insC
- Выявление мутации BRCA1 T300G
- Выявление мутации BRCA1 185delAG
- Выявление мутации BRCA1 4153delA
- Выявление мутации BRCA 2 6174delT
- Выявление мутации CHEK2 1100delC



Рак молочной железы (РМЖ) – самое распространенное из всех онкозаболеваний у женщин. По статистике, одна из девяти женщин заболевает раком молочной железы в течение жизни. Около 10% всех случаев РМЖ — это наследственная форма рака, обусловленная наследуемыми мутациями (необратимыми изменениями) в генах.

Около 10% всех случаев РМЖ — это наследственная форма рака, обусловленная наследуемыми мутациями.

На сегодняшний день известен ряд генов, наследуемые мутации в которых приводят к возникновению семейных форм РМЖ и рака яичников. Наиболее изученными среди них являются гены *BRCA1* и *BRCA2*. В организме человека белки, кодируемые этими генами: восстанавливают целостность поврежденных молекул ДНК, нормализуют баланс эстрогенов, тормозят деление пораженных клеток, препятствуют метастазированию. В результате мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* происходит повреждение клетки, вследствие чего активизируются процессы бесконтрольного деления, что и приводит к возникновению раковой опухоли.

Наличие мутаций в этих генах не означает, что обязательно разовьется рак молочной железы, но этот риск в течение жизни по некоторым данным приближается к 90% (!).

Ген *CHEK2* кодирует протеинкиназу, активирующуюся в ответ на повреждение молекулы ДНК. Данный опухолевый супрессор контролирует вход клетки в митоз, репарацию ДНК. Наследственная мутация 1100delC приводит к синтезу неполноценного укороченного белка *CHEK2*. Мутация 1100delC в гене *CHEK2* приводит к увеличению риска развития рака молочной железы в 2 – 10 раз. Мутация *CHEK2* 1100delC также ассоциирована с повышенным риском опухолей других локализаций (яичника, простаты, толстой кишки, желудка) и может встречаться в «раковых семьях» с отсутствием генетических дефектов генов *BRCA1* и *BRCA2*.

Выявление мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* крайне важно и для тех пациенток, у которых диагноз РМЖ уже установлен. Зная факт наличия мутации, можно выбрать оптимальное лечение уже в первой линии химиотерапии. Этот анализ позволяет назначить эффективный противоопухолевый препарат: у носителей мутаций чувствительность к различным противоопухолевым препаратам отличается от таковой у лиц с отсутствием мутаций.

Наборы реактивов для выявления мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK2*

Регистрационное удостоверение ФСР 2012/13492.

Наборы реактивов Real-time-PCR-*BRCA1-5382insC*, Real-time-PCR-*BRCA1-T300G*, Real-time-PCR-*BRCA1-185delAG*, Real-time-PCR-*BRCA1-4153delA*, Real-time-PCR-*BRCA2-6174delT*, Real-time-PCR-*CHEK2-1100delC* предназначены для выявления мутаций, связанных с наследственными формами рака молочной железы и яичников.

Наборы предназначены для клинической диагностики *in vitro*.



Характеристики наборов

Наборы содержат достаточное количество реагентов для проведения 50 реакций. Наборы оптимизированы для использования с амплификатором для проведения ПЦР в режиме реального времени "CFX96" (Bio-Rad, США). Использование других приборов возможно, но может потребовать изменения параметров ПЦР и повлиять на чувствительность метода.



Материал для исследования

В качестве материала для анализа используется геномная ДНК человека. Рекомендуемое количество ДНК для проведения одной реакции составляет 10-100 нг. При выделении ДНК рекомендуем использовать набор для выделения ДНК из цельной крови («Blood DNA Kit», Кат.№ 31601, 31602). При использовании других технологий выделения ДНК рекомендуем работать с количествами ДНК, по крайней мере, в 4 раза превышающими минимально возможные.

Минимальное количество ДНК, необходимое для реакции, – 2 нг. Максимальное количество ДНК, которое может быть использовано для 1 реакции, – 1000 нг.



Состав набора

Набор содержит реактивы достаточные для проведения 50 реакций с образцами ДНК и контролями. Набор состоит из пробирок с реагентами с цветными крышками и инструкции по применению.



Условия хранения

Хранить в темноте при -18⁰C в течение 12 месяцев.

Кат. №	Наименование анализа	Сокращенное наименование	Количество реакций
20101	Набор реагентов для выявления мутации BRCA1 5382insC с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR BRCA1-5382insC	50
20301	Набор реагентов для выявления мутации CHEK2 1100delC с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR CHEK2-1100delC	50
21101	Набор реагентов для выявления мутации BRCA1 185delAG с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR BRCA1-185delAG	50
21201	Набор реагентов для выявления мутации BRCA1 T300G с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR BRCA1-T300G	50
21301	Набор реагентов для выявления мутации BRCA1 4153delA с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR BRCA1-4153delA	50
21401	Набор реагентов для выявления мутации BRCA2 6174delT с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR BRCA2-6174delT	50



Принцип действия наборов реактивов

Real-time-PCR-BRCA1-5382insC

Real-time-PCR-BRCA1-T300G

Real-time-PCR-BRCA1-185delAG

Real-time-PCR-BRCA1-4153delA

Real-time-PCR-BRCA2-6174del

Real-time-PCR-CHEK2-1100delC

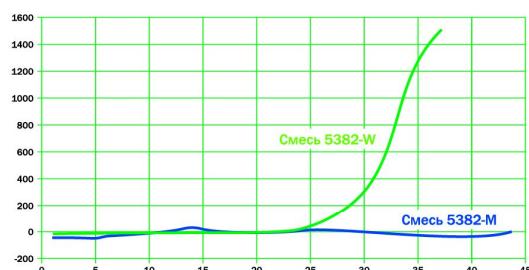
Анализ генетических нарушений проводится методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени. Продукты ПЦР генов *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK2* идентифицируются в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зонда, меченного FAM. ПЦР смесь содержит Таq ДНК полимеразу. Набор также включает ДНК положительного стандарта с мутацией в гене *BRCA1/BRCA2/CHEK2* и ДНК отрицательного стандарта (ДНК человека без мутации).

Для выполнения анализа необходимо провести 2 реакции с исследуемым образцом ДНК:

- с использованием смеси праймеров для детекции ДНК гена *BRCA1/ BRCA2/ CHEK2* дикого типа(«5382-W», «300-W», «6174-W», «4153-W», «1100-W»);
- с использованием смеси праймеров для детекции ДНК гена *BRCA1/ BRCA2/ CHEK2* с мутацией («5382-M», «300-M», «6174-M», «4153-M», «1100-M»).

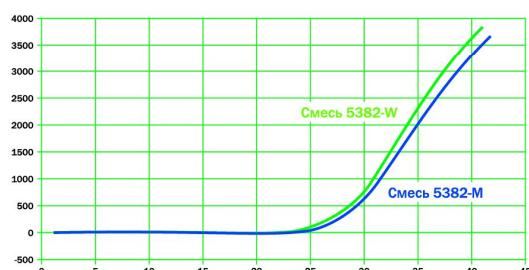
В каждый эксперимент рекомендуется включать ПЦР с положительным и отрицательным стандартами и контролем без матрицы.

Сбор данных происходит в ходе выполнения ПЦР непосредственно в закрытой пробирке, что минимизирует риск контаминации и существенно упрощает процесс анализа.



Кривая амплификации геномной ДНК, не содержащей мутацию *BRCA1* 5382insC

• Образец является отрицательным (без мутации), если при использовании смеси праймеров для детекции ДНК гена дикого типа появляется кривая амплификации, которая пересекает порог флуоресценции не позднее 35 цикла, а кривая амплификации при использовании смеси праймеров для детекции ДНК гена с мутацией отсутствует или появляется не ранее чем через 6 циклов после кривой амплификации ДНК гена дикого типа.

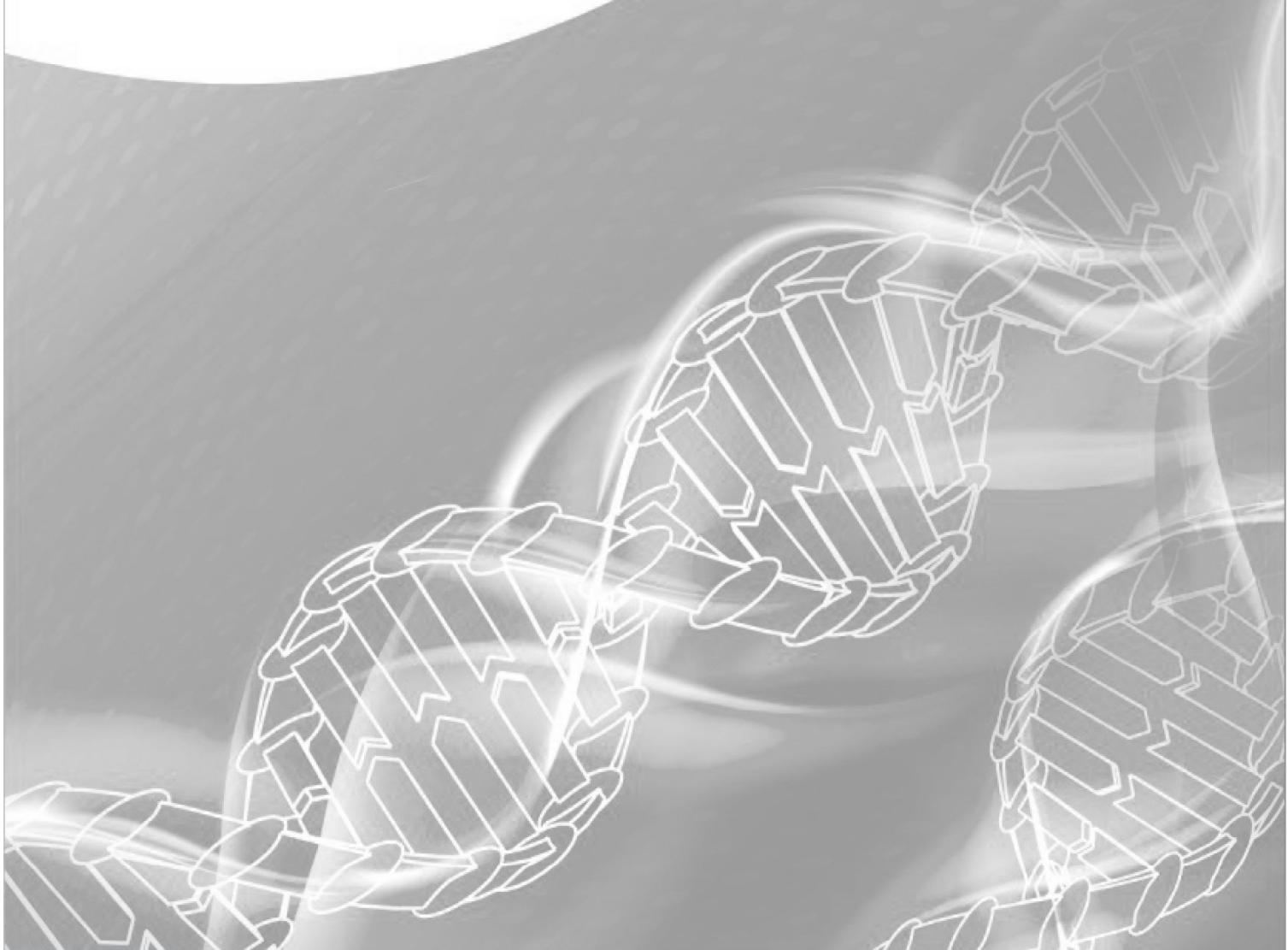


Кривая амплификации геномной ДНК, содержащей мутацию *BRCA1* 5382insC

• Образец является положительным (содержащим мутацию), если при использовании смесей праймеров для детекции ДНК гена дикого типа и ДНК гена с мутацией появляются кривые амплификации, пересекающие порог флуоресценции с разницей не более 2 циклов (в идеальном случае одна кривая должна накладываться на другую).



Наборы реагентов для детекции соматических мутаций





Доказательная медицина продемонстрировала, что таргетная терапия, целенаправленно воздействующая на опухолевые «мишени» (белки, рецепторы, гены), на сегодняшний день является наиболее эффективной в лечении новообразований. Направленное действие препаратов увеличивает выживаемость онкологических больных.

Ген KRAS. Анализ мутаций гена *KRAS* в клетках опухоли при метастазирующем колоректальном раке необходим для идентификации пациентов которым показана анти-EGFR терапия. Мутации в 12 или 13 кодонах гена *KRAS* в 40% случаев приводят к метастазирующему колоректальному раку (РТПК), что коррелирует с резистентностью опухолей к терапии антителами против *EGFR*.

Препараты Эрбитукс (Цетуксимаб) и Вектибикс (Панитумумаб) на основе гуманизированных моно克лональных антител к рецептору эпидермального фактора роста *EGFR* применяются для таргетной терапии метастазирующего колоректального рака. Эффективность лечения этими препаратами зависит от ряда факторов, в том числе мутаций гена *KRAS*.

Ген BRAF кодирует внутриклеточный белок, который является компонентом сигнальных каскадов RAS-MAPK и RAS-MEK-ERK, регулирующих пролиферацию клетки в ответ на внешние митогенные стимулы. Белок *BRAF* имеет киназную активность которая необходима для передачи сигнала при его активации. Соматические активирующие мутации *BRAF* часто встречаются при меланоме кожи, опухолях щитовидной железы, раке яичников, раке толстой и прямой кишки. Более 80% активирующих мутаций *BRAF* составляет точечная мутация в 600 кодоне GTG→GAG (подчеркнут мутированный нуклеотид) приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту.

Препарат Зелбораф (Вемурафениб) (Roche) является ингибитором киназной активности *BRAF-V600E*. Управление США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) разрешило применение этого препарата при неоперабельной или метастатической меланоме с мутацией *BRAF-V600E*. Другие подобные препараты проходят клинические испытания для таргетной терапии меланом и других опухолей, несущих мутацию V600E.

Ген EGFR кодирует рецептор эпидермального фактора роста *EGFR* (HER1), который играет важную роль в пролиферации эпителиальных клеток.

Препараты Iressa® (Гефитиниб), Tarceva® (Эрлотиниб) и Gilotrif® (Афатиниб) являются ингибиторами ТК *EGFR* и применяются в современной таргетной терапии НМРЛ. Чувствительность опухоли к ингибиторам ТК-*EGFR* коррелирует с наличием активирующих мутаций в гене *EGFR*, которые наблюдаются примерно в 15-50% случаев НМРЛ. Подавляющее большинство мутаций связанных с чувствительностью (~90%) — это делеции в 19 экзоне (ex19del) или замена L858R в 21 экзоне; каждая из этих мутаций составляет ~45% случаев опухолей с мутациями. Опухоли с мутациями Del19 или L858R наиболее чувствительны к терапии ингибиторами ТК-*EGFR*. Прочие мутации, связанные с чувствительностью (G719X, L861Q, S768I и некоторые другие), составляют в сумме ~5% мутантных случаев. Инсерции в 20 экзоне связаны с устойчивостью к ингибиторам ТК и составляют ~3% опухолей с мутациями. Еще одна мутация связанная с устойчивостью – T790M - составляет 1-3% случаев *de novo* и около 50% случаев резистентности которая развивается после химиотерапии ингибиторами ТК.



При лечении ингибиторами TK-EGFR улучшение состояния наблюдается у 80% пациентов с мутациями. У отдельных пациентов с мутациями EGFR положительный эффект очень сильный и длительный.

По рекомендациям Европейского Общества Медицинских Онкологов (ESMO) и Американского Общества Клинической Онкологии (ASCO) наличие активирующих мутаций в EGFR является показанием к применению ингибиторов TK EGFR.

Ген DPYD кодирует фермент дигидропиридимидиндегидрогеназу, который играет ключевую роль в катаболизме 5-фторурацила, который является одним из наиболее популярных препаратов, используемых в химиотерапии онкологических заболеваний различных локализаций (желудочно-кишечного тракта, кожи, молочной железы и т.д.). До 90% препарата превращается в организме в неактивную форму посредством этого фермента и лишь 10% достигает мишени. Мутация DPYD G735A – наиболее часто встречающаяся мутация в гене DPYD человека. Эта мутация приводит к формированию белка DPYD с полным отсутствием ферментативной активности. Из-за сниженной интенсивности деградации 5-фторурацила у пациентов, имеющих данную мутацию, эффективная доза препарата оказывается выше ожидаемой в 5-10 раз и вызывает появление различных токсических реакций. Анализ мутаций в гене DPYD перед применением 5-фторурацила позволит, в случае обнаружения мутации, снизить дозу препарата и уменьшить его токсический эффект или подобрать другой препарат.

Ген HER2/neu. Ген рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (*HER2/neu*) кодирует трансмембранный белок (*HER2*), который является одним из четырех членов семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека. Рецептор *HER2* один из наиболее значимых молекулярных маркёров при раке молочной железы (РМЖ). У 25-30% больных РМЖ, количество *HER2* белка на поверхности раковых клеток увеличено по сравнению с нормой, что является одним из маркеров высокоаггрессивной формы РМЖ, а также показанием к использованию таргетного препарата Герцептин. На сегодняшний день анализ *HER2*-статуса опухоли при метастатическом раке молочной железы рекомендован Европейским обществом онкологов как необходимый элемент исследования больного.

Наборы реактивов для выявления мутаций в генах KRAS, BRAF, EGFR



Назначение наборов

Набор реактивов Real-time-PCR-KRAS-7M предназначен для анализа 7 мутаций в 12 и 13 кодонах гена KRAS, коррелирующих с резистентностью опухолей к лечению ингибиторами EGFR.

Gly12Cys (GGT→TGT)

Gly12Asp (GGT→GAT)

Gly12Arg (GGT→CGT)

Gly12Asp (GGT→GAC)

Gly12Ser (GGT→AGT)

Gly12Ala (GGT→GCT)

Gly12Val (GGT→GTT)



Набор реагентов **Real-time-PCR-BRAF-V600E** предназначен для выявления точечной мутации GTG→GGG в 600 кодоне гена *BRAF*, коррелирующей с чувствительностью опухолей к лечению ингибиторами *BRAF*. Анализ проводится методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени.

Наборы реактивов предназначенные для выявления точечной мутации CTG→CGG в 858 кодоне гена *EGFR* и микроделеций 9-18 пар нуклеотидов гена *EGFR* в районе соответствующем 746-750 аминокислотам белка (**Real-time-PCR-EGFR-2M**), для выявления активирующих мутаций в 18-21 экзонах гена *EGFR* (Del19, L858R, L861Q, G719A/C/S, S768I, T790M) (**Real-time-PCR-EGFR-7R**) коррелирующих с чувствительностью опухолей к лечению ингибиторами ТК-EGFR.

Набор **Real-time-PCR-KRAS-7M** предназначен для клинической диагностики.
Регистрационное удостоверение ФСР 2012/13492.



Характеристики наборов

Наборы оптимизированы для использования с амплификатором для ПЦР в режиме реального времени “CFX96” (Bio-Rad, США). Использование других приборов возможно, но может потребовать изменения параметров ПЦР и повлиять на чувствительность метода.



Материал для исследования

В качестве материала для анализа используется геномная ДНК. Минимальное количество ДНК, необходимое для анализа, – 2 нг. Максимальное количество ДНК, которое может быть использовано для 1 анализа, – 1000 нг.

Ген	Количество геномной ДНК для ПЦР	Чувствительность метода
<i>KRAS</i>	1000 - 2000 копий гена	5% и более мутантных копий гена
<i>BRAF</i>	1000 - 8000 копий гена	1% и более мутантных копий гена
<i>EGFR</i>	1000 - 2000 копий гена	1% и более мутантных копий гена (Real-time-PCR-EGFR-2M, Real-time-PCR-EGFR-7R) 5% и более мутантных копий гена для мутаций G719X и T790M (Real-time-PCR-EGFR-7R)



Состав наборов

Наборы содержат реактивы достаточные для проведения 12/36/50 реакций с образцами ДНК и контролями. Положительный контроль представляет собой ДНК-копии исследуемого гена с мутацией на фоне ДНК человека без мутаций и позволяет выявить наличие ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложно-



отрицательным результатам. Набор также включает контроль без матрицы (вода).

Наборы состоят из пробирок с реагентами с цветными крышками и инструкции по применению.



Условия хранения

Хранить в темноте при -18°C в течение 12 месяцев.

Кат. №	Наименование анализа	Сокращенное наименование	Количество реакций
21501/ 21502	Набор реагентов для выявления 7 мутаций в 12 и 13 кодонах гена KRAS с использованием аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR KRAS-7M	12/36
21701/ 21702	Набор реагентов для выявления мутации V600E в гене BRAF с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR BRAF-V600E	12/36
21801/ 21802	Набор реагентов для выявления 2-х мутаций в гене EGFR с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR EGFR-2M	12/36
21811 21812	Набор реагентов для выявления 7-ми мутаций в гене EGFR с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR EGFR-7R	12/36
32001	Набор стандартов с мутацией V600E в гене BRAF		4 x 100 нг
32101	Набор стандартов ДНК с 7 мутациями в гене KRAS		2 x 200 нг
32201	Набор стандартов ДНК с мутацией L858R в гене EGFR		4 x 100 нг
32301	Набор стандартов ДНК с делецией 746-750 в гене EGFR		3 x 100 нг
32401	Набор стандартов ДНК с мутацией L858R и делецией 746-750 в гене EGFR		7 x 100 нг



Принцип действия наборов реагентов

Real-time-PCR-KRAS-7M

Real-time-PCR-BRAF-V600E

Real-time-PCR-EGFR-2M

Real-time-PCR-EGFR-7R

Анализ проводится методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Продукты ПЦР исследуемого гена (KRAS/ BRAF/ EGFR) идентифицируются в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зонда меченного FAM. Наборы содержат реагенты для анализа мутации исследуемого гена (KRAS/ BRAF/ EGFR) и реагенты для внутреннего контроля с использованием красителя ROX. Внутренний контроль позволяет выявить наличие ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам. ПЦР смеси состоят из всех необходимых реагентов за исключением Тау ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке. Наборы также включают ДНК положительного стандарта с мутацией в исследуемом гене (KRAS/ BRAF/ EGFR) и ДНК отрицательного стандарта (ДНК человека без мутации).



Тест на наличие мутаций в исследуемом гене (*KRAS/ BRAF/ EGFR*) состоит из двух этапов:

I Проверка образцов ДНК в контрольной ПЦР

Контрольная реакция проводится для оценки пригодности образцов ДНК для дальнейшего анализа, позволяя выбрать оптимальную концентрацию ДНК исследуемого гена для теста. Причинами непригодности образцов могут быть частичная деградация или химические модификации ДНК, возникшие при фиксации ткани, которые могут ингибиовать или снижать эффективность ПЦР. Различные разведения образцов ДНК сравниваются в контрольной ПЦР с ДНК отрицательного стандарта входящей в набор.

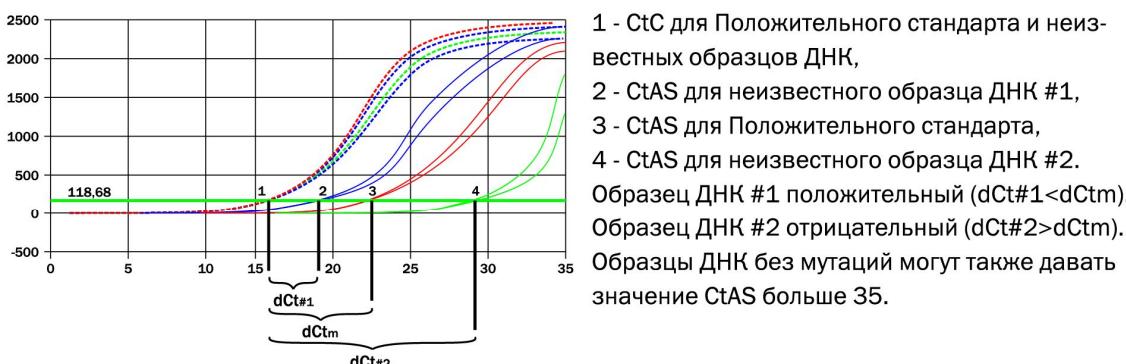
Качество и количество ДНК оценивается по величине Ct, которая соответствует количеству циклов ПЦР, при которых кривая флуоресценции пересекает заданный уровень фона. Для этого набор содержит дополнительное количество ПЦР смеси №1, амплифицирующей константный район исследуемого гена. Для дальнейшей аллель-специфичной ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину Ct относительно отрицательного ДНК стандарта.

II Проведение аллель-специфичной ПЦР на мутации в исследуемом гене (*KRAS/ BRAF/ EGFR*)

На этом этапе выбранные разведения ДНК тестируют в аллель-специфичной ПЦР. Для этого набор включает смесь для ПЦР, содержащую праймеры, специфичные к выявленным мутациям в исследуемом гене. Для нормировки результатов все образцы необходимо повторно тестировать в реакции с контрольной смесью. Также в каждый эксперимент необходимо включать ПЦР с положительным стандартом и контролем без матрицы. Для корректности результата все образцы тестируют в дублях.

Для всех образцов ДНК результаты ПЦР для каждой мутации в исследуемом гене (*KRAS/ BRAF/ EGFR*) представляют в виде разницы $dCt = CtAS - CtC$, где CtAS – среднее Ct образца ДНК в ПЦР специфичной к данной мутации в исследуемом гене (*KRAS/ BRAF/ EGFR*), CtC - среднее Ct того же образца ДНК в контрольной ПЦР. Затем dCt образца сравнивают с dCt положительного стандарта содержащего ДНК с каждой мутацией для исследуемого гена (*KRAS/ BRAF/ EGFR*).

Образец является положительным (содержащим мутацию), если dCt образца равно или меньше dCt положительного стандарта.



Пример кривых флуоресценции в контрольной (пунктирные линии) и аллель-специфичной (сплошные линии) ПЦР для Положительного стандарта (красный) и неизвестных образцов ДНК (синий и зеленый).



Образец является отрицательным (без мутации или содержание мутации: менее 5% для гена *KRAS*, или менее 1% для генов *BRAF* и *EGFR*), если dCt образца больше dCt положительного стандарта.

Образец	Ct _{AS}	Ct _c	dCt (Ct _{AS} - Ct _c)	Результат
# 1	34.32	19.25	15.07	Отриц.
# 2	18.77	16.57	2.20	Положит.
# 3	30.35	18.53	11.82	Отриц.
# 4	25.83	17.32	8.51	Отриц.
Положит. стандарт	21.27	17.06	4.21	Отриц.

Анализ на выявлении мутации в образцах ДНК исследуемого гена (*KRAS/ BRAF/ EGFR*).

Набор реактивов для выявления мутации G735A в гене *DPYD* методом ПЦР в режиме реального времени

Real-time-PCR-DPYD-G735A



Назначение набора

Набор реактивов Real-time-PCR-DPYD-G735A предназначен для выявления точечной мутации GGT→GCT в 735 кодоне гена *DPYD*, коррелирующей с токсичностью для организма 5-фторурацила.

Набор оптимизирован для использования с амплификатором для ПЦР в режиме реального времени "CFX96" (Bio-Rad, США). Использование других приборов может потребовать изменения параметров ПЦР и повлиять на чувствительность метода. Набор предназначен только для исследовательского применения.



Характеристики набора

Набор содержит достаточное количество реагентов для проведения 50 реакций. Исходным материалом для проведения анализа должна быть геномная ДНК. Рекомендуемое количество ДНК для проведения одной реакции составляет 10-100 нг. Минимальное количество ДНК, необходимое для анализа, – 2 нг. Максимальное количество ДНК, которое может быть использовано для 1 анализа, – 1000 нг.



Материал для исследования

В качестве материала для анализа используется геномная ДНК.



Условия хранения

Хранить в темноте при -18°C в течение 12 месяцев.



Кат. №	Наименование анализа	Сокращенное наименование	Количество реакций
20801	Набор реагентов для выявления мутации G735A в гене DPYD с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR DPYD-G735A	50



Принцип действия наборов реактивов

Real-time-PCR-DPYD-G735A

Анализ проводится методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. Для выполнения анализа необходимо провести две реакции с исследуемым образцом ДНК:

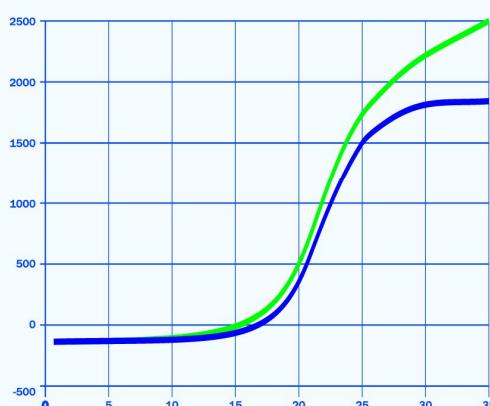
- с использованием смеси праймеров «735-W» (для детекции ДНК гена DPYD дикого типа);
- с использованием смеси праймеров «735-M» (для детекции ДНК гена DPYD с мутацией G735A).

В каждый эксперимент рекомендуется включать ПЦР с положительным и отрицательным стандартами и контролем без матрицы. Сбор данных происходит в ходе выполнения ПЦР непосредственно в закрытой пробирке, что минимизирует риск контаминации и существенно упрощает процесс анализа.



Кривая флюoresценции, ДНК не содержит мутации*.

- Образец является отрицательным (без мутации), если при использовании смеси праймеров «735-W» появляется кривая амплификации, которая пересекает порог флуоресценции не позднее 35 цикла и отсутствует кривая амплификации при использовании смеси праймеров «735-M» или пересекает порог флуоресценции не ранее чем через 8 циклов после кривой W.



Кривая флюoresценции, ДНК содержит мутацию*.

- Образец является положительным (содержащим мутацию), если при использовании смесей праймеров «735-M» и «735-W» появляются кривые амплификации, пересекающие порог флуоресценции с разницей не более чем в 1 цикл (в идеальном случае одна кривая должна накладываться на другую).

*ДНК "дикого типа" (W - синие линии) и ДНК с мутацией (M-зелёные линии)



Набор реагентов для относительного определения дозы гена *HER2/neu* в геномной ДНК человека методом ПЦР в режиме реального времени

Real-time-PCR-HER2/neu



Назначение набора

Набор реактивов Real-time-PCR-*HER2/neu* предназначен для быстрого и эффективного анализа дозы онкогена *HER2/neu* относительно референс-гена в геномной ДНК человека с помощью ПЦР в реальном времени. Данная технология имеет хорошую корреляцию с традиционным иммуногистохимическим (ИГХ) методом диагностики *HER2*-статуса опухолей. Кроме того, ПЦР-РВ является прекрасной альтернативой методу флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Сбор данных происходит в ходе выполнения ПЦР непосредственно в закрытой пробирке, что минимизирует риск контаминации и существенно упрощает процесс анализа.

Набор оптимизирован для использования с амплификатором для ПЦР в режиме реального времени "CFX96" (Bio-Rad, США). Использование других приборов может потребовать изменения параметров ПЦР и повлиять на чувствительность метода. Набор предназначен для клинической диагностики *in vitro*.

Регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13492.



Характеристики набора

Набор содержит достаточное количество реагентов для проведения 50 реакций. Рекомендуемое количество ДНК для проведения одной реакции составляет 1-400 нг.



Материал для исследования

Исходным материалом для проведения анализа должна быть геномная ДНК.



Условия хранения

Хранить в темноте при -18°C в течение 12 месяцев.

Кат. №	Наименование анализа	Сокращенное наименование	Количество реакций
20701	Набор реагентов для определения дозы гена <i>HER2/neu</i> в геномной ДНК человека с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR HER2/neu	50



Принцип действия набора реактивов

Real-time-PCR-HER2/neu

Доза онкогена *HER2/neu* в геномной ДНК человека определяется относительно референс-гена. В качестве референс-гена в данном наборе использован ген *UBC*, доза которого остается постоянной как в нормальной, так и в опухолевой ДНК. Продукты ПЦР гена *HER2/neu* и референс-гена идентифицируются в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зондов меченных FAM или ROX. Набор также включает ДНК положительного стандарта с увеличенной дозой гена *HER2/neu* и ДНК нормировочного стандарта с нормальной дозой гена *HER2/neu*.

Тест на определение дозы гена *HER2/neu* состоит из двух этапов:

I. Проверка образцов ДНК в нормировочной ПЦР

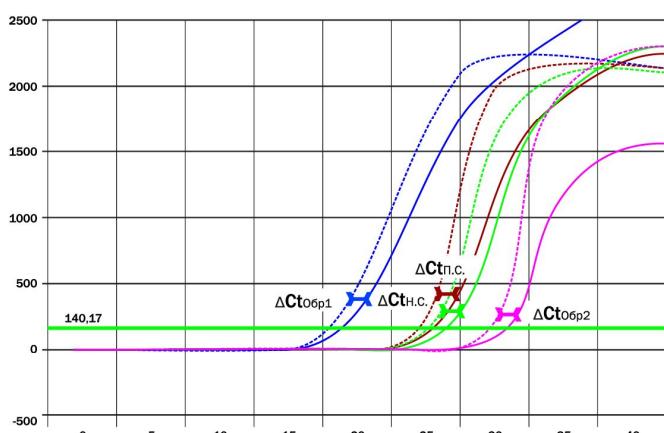
Различные разведения образцов ДНК сравниваются в нормировочной ПЦР с ДНК нормировочного стандарта, входящей в набор. Для дальнейшего анализа дозы гена *HER2/neu* выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину Ct относительно нормировочного ДНК стандарта.

II. Анализ дозы гена *HER2/neu* в нормированных по концентрации образцах ДНК методом ПЦР в реальном времени

Дозу гена *HER2/neu* в каждом образце опухолевой ДНК определяют относительно дозы референс-гена *UBC* в этом же образце. Для определения дозы гена *HER2/neu* используется метод **ΔΔCt** с дальнейшим переводом полученного значения в абсолютные числа по формуле:

$N_{HER2/neu} = 1,95^{\Delta\Delta Ct}$, где $N_{HER2/neu}$ – относительное изменение дозы гена *HER2/neu*; 1,95 – эффективность ПЦР для генов *HER2/neu* и *UBC*, полученная экспериментальным путем.

- Образец считается с **увеличенной дозой гена *HER2/neu***, если значение $N_{HER2/neu} \geq 2$.
- Образец считается с **неувеличенной дозой гена *HER2/neu***, если значение $N_{HER2/neu} < 1,5$.
- Результат анализа дозы гена *HER2/neu* следует считать **сомнительным**, если $1,51 < \text{значение } N_{HER2/neu} < 1,99$.



Кривые флуоресценции при анализе дозы гена *HER2/neu* (пунктирные линии) относительно референс-гена *UBC* (сплошные линии) для:

Положительного стандарта,

Нормировочного стандарта,

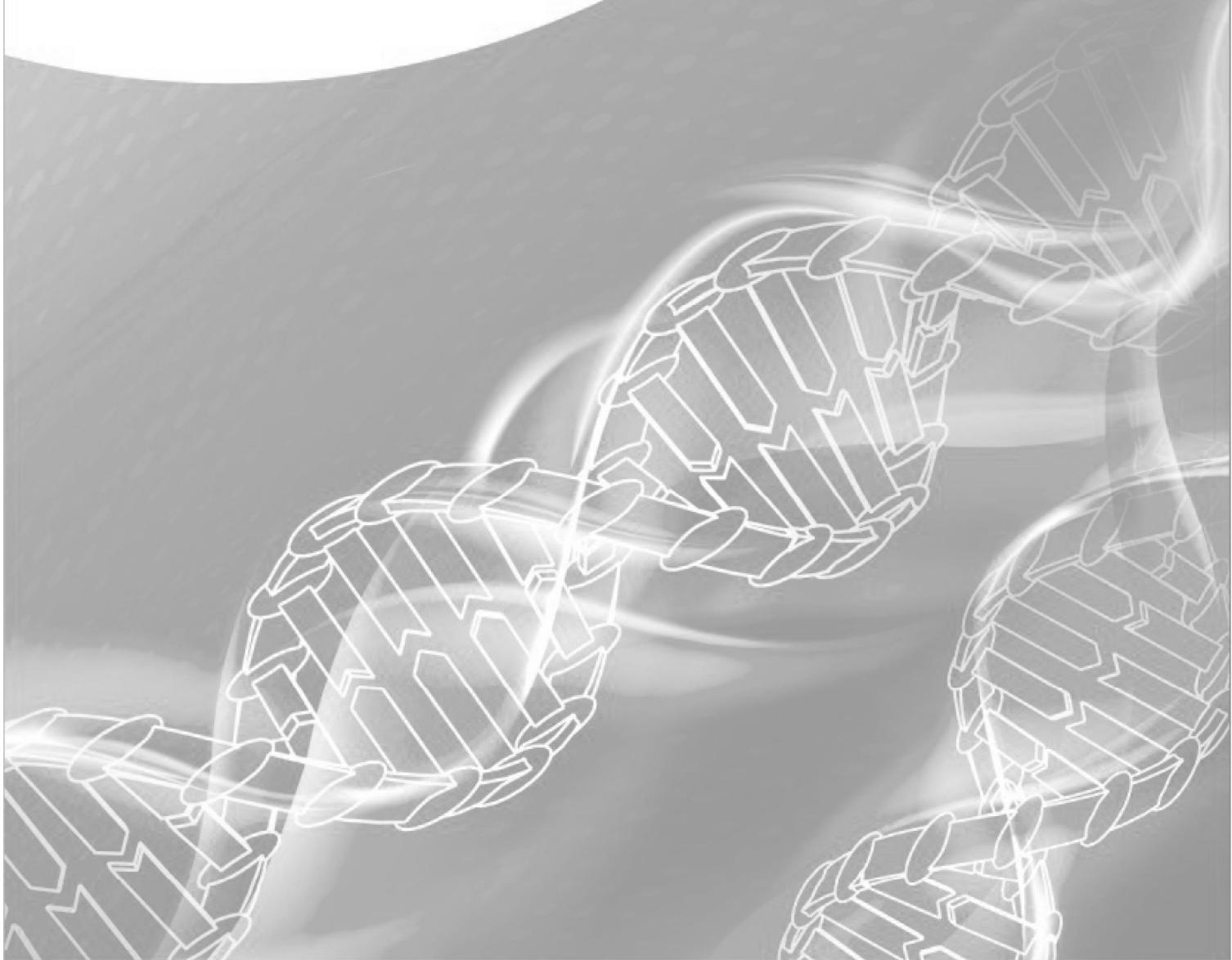
и неизвестных образцов ДНК:

без увеличения дозы гена *HER2/neu*,

доза гена *HER2/neu* увеличена.



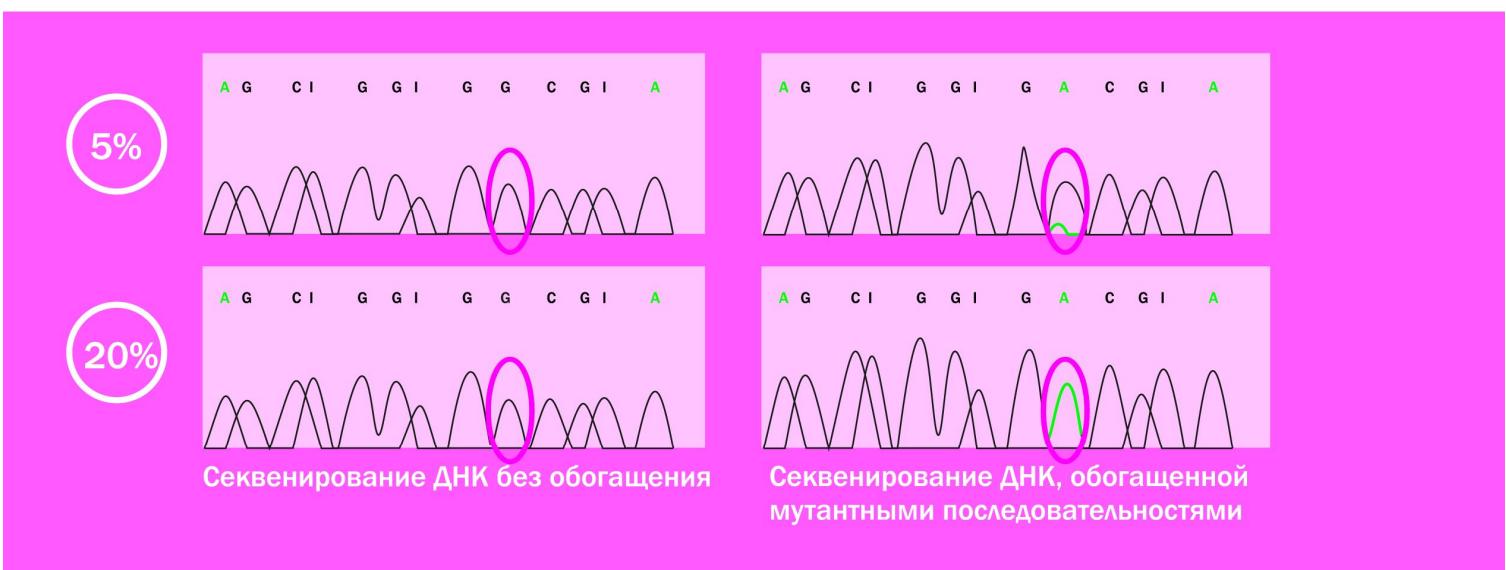
Наборы реагентов для избирательного обогащения ампликонов ДНК





Для анализа мутаций в генах *KRAS* при колоректальном раке и *EGFR* при раке легкого широко используется метод секвенирования по Сэнгеру.

Метод Сэнгера является универсальным, но имеет существенное ограничение - низкая чувствительность. Для достоверного определения последовательности нуклеотидов методом Сэнгера, количество мутантной ДНК в образце должно составлять по меньшей мере 20-25%, что соответствует 40-50% опухолевых клеток при гетерозиготной мутации. В большинстве случаев участок опухолевой ткани невозможно отделить от нормальной ткани и участков воспалительной инфильтрации, что в процессе секвенирования может привести к содержанию ДНК с мутацией в образце менее 25%, и как следствие к ложно-отрицательным результатам. С целью повышения чувствительности традиционного секвенирования по Сэнгеру нами был разработан метод обогащения мутантными последовательностями *KRAS* и *EGFR* с помощью метода ПЦР с LNA-модифицированными олигонуклеотидами. Чувствительность наборов SelectSeq-*KRAS*, SelectSeq-*EGFR* составляет 5% и более мутантных копий генов *KRAS* и *EGFR* на фоне ДНК «дикого типа».



SelectSeq-*KRAS*

SelectSeq-*EGFR*



Назначение набора

Наборы предназначены для избирательной амплификации фрагментов ДНК с любыми мутациями 12 или 13 кодонов гена *KRAS* и делециями 19 экзона и мутации L858R в 21 экзоне гена *EGFR* для последующего анализа методом секвенирования по Сэнгеру. Наборы предназначен только для исследовательского применения.



Характеристики набора

Для ПЦР используется ДНК, выделенная из свежезамороженной ткани или ткани фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPET) без дополнительной диссекции что существенно упрощает процесс подготовки образцов.



Ген	Количество геномной ДНК для ПЦР	Чувствительность метода
<i>KRAS</i>	1000 - 2000 копий гена	5% и более мутантных копий гена
<i>BRAF</i>	1000 - 2000 копий гена	5% и более мутантных копий гена



Принцип действия набора

Наборы содержат смеси для ПЦР, прямой и обратный праймеры, используемые в дальнейшем для секвенирующей ПЦР. Процесс получения ПЦР продукта состоит из двух этапов:

I. Селективное обогащение ДНК с мутацией

На этом этапе нарабатываются преимущественно ампликоны с мутацией, а амплификация ДНК «дикого типа» подавляется с помощью LNA-модифицированных олигонуклеотидов, блокирующих амплификацию фрагментов без мутации. Продукт, полученный на данном этапе, имеет низкую концентрацию и может не наблюдаться на электрофорезе.

II. Амплификация обогащенного продукта

На данном этапе проводится амплификация ДНК для достижения концентрации, достаточной для последующего секвенирования. Полученный продукт в дальнейшем очищается от оставшихся компонентов ПЦР и праймер-димеров любым общепринятым методом (элюзия из ПААГ геля, колонки и пр.). Очищенный продукт используют в секвенирующей ПЦР с праймерами входящими в состав набора согласно протоколу производителя реактивов и/или прибора для секвенирования. При секвенировании продуктов, полученных с помощью наборов SelectSeq-*KRAS* и SelectSeq-*EGFR* выявляются мутации, присутствующие в 5% и более мутантных копий генов *KRAS* и *EGFR* на фоне ДНК «дикого типа». При этом при секвенировании ПЦР продуктов полученных обычным способом, достоверно определяются мутации только в образцах содержащих более 20% мутантных копий генов *KRAS* и *EGFR* на фоне ДНК «дикого типа».



Материал для исследования

В качестве материала для анализа используется геномная ДНК. Минимальное количество ДНК, необходимое для анализа, – 3-6 нг.



Состав набора

Набор содержит реактивы достаточные для проведения 50 реакций.



Условия хранения

Хранить в темноте при -18°C в течение 12 месяцев.

Кат. №	Наименование анализа	Сокращенное наименование	Количество реакций
22101	Набор реагентов для избирательного обогащения ампликонов ДНК с мутациями в 12 и 13 кодонах гена <i>KRAS</i>	SelectSeq- <i>KRAS</i>	50
22201	Набор реагентов для избирательного обогащения ампликонов ДНК с делециями в 19 экзоне и мутацией L858R в 21 экзоне гена <i>EGFR</i>	SelectSeq- <i>EGFR</i>	50



Наборы реактивов для выделения ДНК

- █ Выявление ДНК Blood DNA Kit
- █ Выявление ДНК FFPET DNA-Extraction
- █ Выявление ДНК FFPET Mag DNA-Extraction



Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки

FFPET DNA – Extraction Kit



Назначение набора

Набор реагентов FFPET DNA – Extraction Kit предназначен для выделения геномной ДНК из тканей, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPET). Метод обеспечивает быстрый и высокий выход ДНК, что особенно важно для небольших биопсий. Полученная ДНК может быть использована для ПЦР в режиме реального времени. Только для исследовательского применения.



Принцип действия набора

На первом этапе FFPET срезы ткани помещаются в специальный раствор, в котором одновременно расплывается парафин, лизируется ткань и удаляются форма-линовые швы. Набор не требует депарафинирования кисленим и длительной обработки протеиназой К. На следующем этапе, после лизиса ткани, ДНК экстрагируется хлороформом и осаждается изопропанолом. Осадок ДНК промывается этиловым спиртом, высушивается и растворяется в ТЕ буфере.



Материал для исследования

В качестве материала для выделения ДНК могут использоваться ткани фиксированные формалином и заключенные в парафин, нарезанные на срезы толщиной 10 мкм. Для выделения достаточного количества ДНК общая площадь ткани на срезах должна составить 50-200 мм².

Внимание! Предпочтительна фиксация ткани в нейтральном формалине в фосфатном буфере (10% NBF, pH~7,0) в течение 12-24 часов. Длительная фиксация и применение кислого формалина pH<6 значительно ухудшает пригодность ДНК для ПЦР.



Состав набора

Набор содержит реагенты достаточные для выделения 50 образцов ДНК.



Условия хранения

Набор хранится при комнатной температуре (+15..+25°C). При правильном использовании срок хранения – 12 месяцев.



Набор реагентов для выделения ДНК на магнитных частицах из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки

FFPET Mag DNA – Extraction Kit



Назначение набора

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из тканей, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPET). Метод обеспечивает быстрый и высокий выход ДНК, что особенно важно для небольших биопсий. Полученная ДНК может быть использована для ПЦР в режиме реального времени.



Принцип действия набора

На первом этапе FFPET срезы ткани помещаются в специальный раствор, в котором одновременно расплывается парафин, лизируется ткань и удаляются формалиновые швы. Набор не требует депарафинирования ксиленом и длительной обработки протеиназой К. На следующем этапе пробы обрабатываются многокомпонентным лизирующим раствором, разрушающим комплекс нуклеиновых кислот с белками, после чего ДНК осаждается на магнитные частицы, отмывается спиртовыми растворами и элюируется.



Материал для исследования

В качестве материала для выделения ДНК могут использоваться ткани фиксированные формалином и заключенные в парафин.

Внимание! Предпочтительна фиксация ткани в нейтральном формалине в фосфатном буфере (10% NBF, pH~7,0) в течение 12-24 часов. Длительная фиксация и применение кислого формалина pH<6 значительно ухудшает пригодность ДНК для ПЦР.



Состав набора

Набор содержит реактивы достаточные для выделения 12 образцов ДНК двумя независимыми процедурами по 6 образцов в каждой.



Условия хранения

Набор следует хранить при температуре +2...+8°C. Допускается транспортировка при температуре до +25°C. При правильном использовании срок хранения – 12 месяцев.



Набор для выделения ДНК из цельной крови

Blood DNA kit



Назначение набора

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из цельной крови. Метод обеспечивает быстрый и высокий выход ДНК. Полученная ДНК может быть использована для ПЦР в режиме реального времени.



Принцип действия набора

На первом этапе в специальном растворе клетки лизируются, а белки денатурируются. На следующем этапе происходит сорбция ДНК на SiO₂, промывание и элюирование.



Материал для исследования

В качестве материала для выделения ДНК может использоваться цельная кровь.

Внимание! Не допускается использование для выделения ДНК образцов гепаринизированной крови.



Состав набора

Набор содержит реактивы достаточные для выделения 50 (кат. № 31601) или 100 (кат. № 31602) образцов ДНК.



Условия хранения

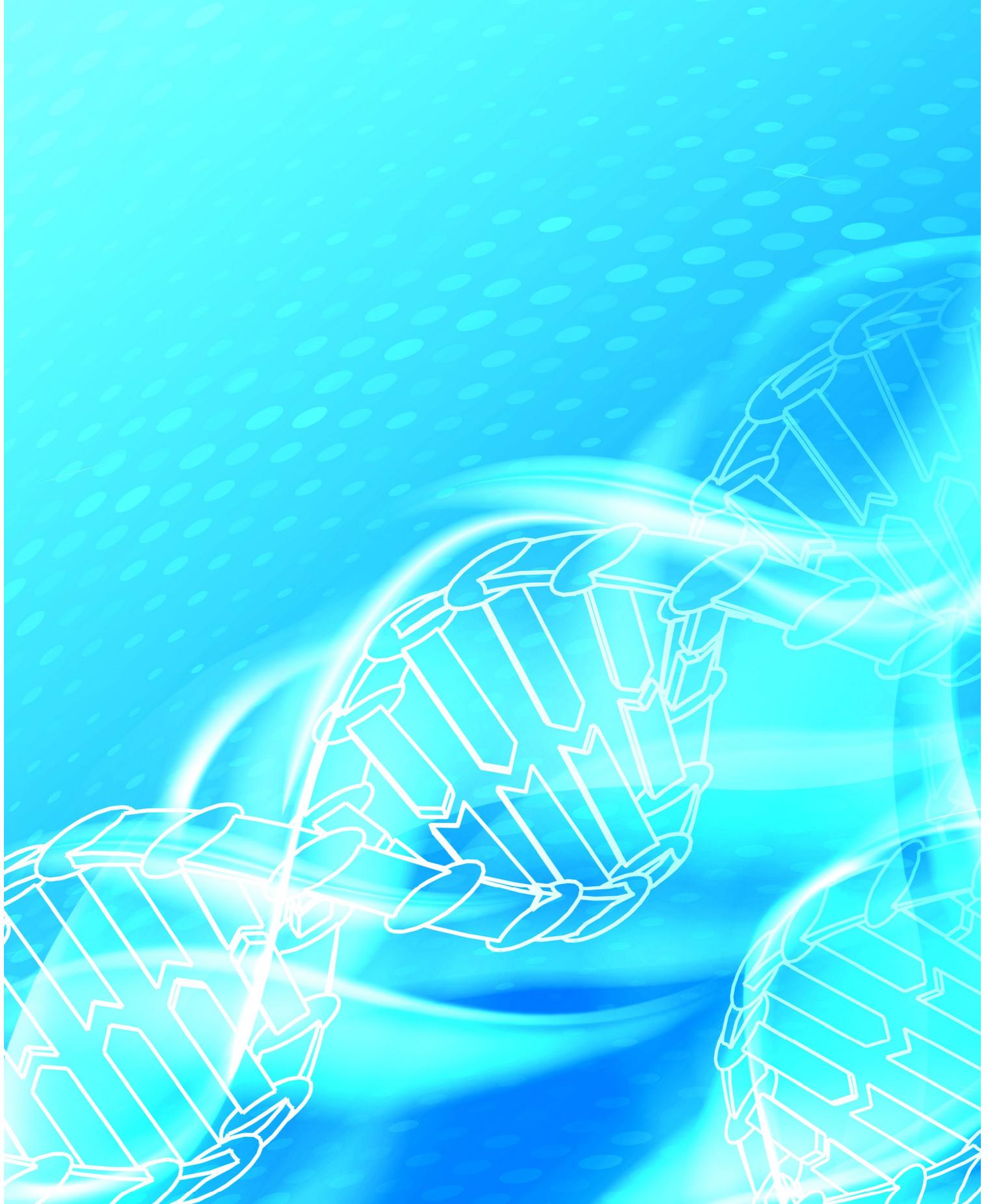
Набор следует хранить при комнатной температуре (+15...+25°C). При правильном использовании срок хранения — 12 месяцев.



Кат. №	Наименование анализа	Сокращенное наименование	Количество реакций
20101	Набор реагентов для выявления мутации <i>BRCA1</i> 5382insC с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>BRCA1</i> -5382insC	50
20301	Набор реагентов для выявления мутации <i>CHEK2</i> 1100delC с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>CHEK2</i> -1100delC	50
20701	Набор реагентов для определения дозы гена <i>HER2/neu</i> в геномной ДНК человека с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>HER2/neu</i>	50
20801	Набор реагентов для выявления мутации G735A в гене <i>DPYD</i> с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>DPYD</i> -G735A	50
21101	Набор реагентов для выявления мутации <i>BRCA1</i> 185delAG с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>BRCA1</i> -185delAG	50
21201	Набор реагентов для выявления мутации <i>BRCA1</i> T300G с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>BRCA1</i> -T300G	50
21301	Набор реагентов для выявления мутации <i>BRCA1</i> 4153delA с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>BRCA1</i> -4153delA	50
21401	Набор реагентов для выявления мутации <i>BRCA2</i> 6174delT с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>BRCA2</i> -6174delT	50
21501/ 21502	Набор реагентов для выявления 7 мутаций в 12 и 13 кодонах гена <i>KRAS</i> с использованием аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>KRAS</i> -7M	12/36
21701/ 21702	Набор реагентов для выявления мутации V600E в гене <i>BRAF</i> с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>BRAF</i> -V600E	12/36
21801/ 21802	Набор реагентов для выявления 2x мутаций в гене <i>EGFR</i> с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>EGFR</i> -2M	12/36
21811/ 21812	Набор реагентов для выявления 7ми мутаций в гене <i>EGFR</i> с использованием ПЦР в режиме реального времени	Real-Time PCR <i>EGFR</i> -7R	12/36
21901/ 21902	Набор реагентов для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов в генах <i>PPARG</i> , <i>FABP2</i> , <i>ADRB2</i> и <i>ADRB3</i> методом ПЦР в режиме реального времени	Real-time-PCR- SNP5	12/36
22101	Набор реагентов для избирательного обогащения ампликонов ДНК с мутациями в 12 и 13 кодонах гена <i>KRAS</i>	SelectSeq- <i>KRAS</i>	50
22201	Набор реагентов для избирательного обогащения ампликонов ДНК с делециями в 19 экзоне и мутацией L858R в 21 экзоне гена <i>EGFR</i>	SelectSeq- <i>EGFR</i>	50



Кат. №	Наименование анализа	Сокращенное наименование	Количество реакций
Наборы для выделения ДНК			
31601/ 31602	Набор для выделения ДНК из цельной крови	Blood DNA Kit	50/100
31901	Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, залитых в парафиновые блоки	FFPET DNA-Extraction	50
32501	Набор реагентов для выделения ДНК на магнитных частицах из срезов тканей, залитых в парафиновые блоки	FFPET Mag DNA-Extraction	12
Стандарты			
31201	Геномная ДНК из мужской плаценты		30 мкг
31202	Геномная ДНК из женской плаценты		30 мкг
32001	Набор стандартов с мутацией V600E в гене <i>BRAF</i>		4 x 100 нг
32101	Набор стандартов ДНК с 7 мутациями в гене <i>KRAS</i>		2 x 200 нг
32201	Набор стандартов ДНК с мутацией L858R в гене <i>EGFR</i>		4 x 100 нг
32301	Набор стандартов ДНК с делецией 746-750 в гене <i>EGFR</i>		3 x 100 нг
32401	Набор стандартов ДНК с мутацией L858R и делецией 746-750 в гене <i>EGFR</i>		7 x 100 нг



ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ.
НЕОБХОДИМА КОНСУЛЬТАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТА.

18+



630117, г.Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

тел. факс: +7(383) 334-86-14

е-mail: info@biolinklab.ru

www.biolinklab.ru