



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

 Корниенко А.А.

«21» октября 2022 г.



Набор реагентов для выявления мутаций гена *PIK3CA*
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

в режиме реального времени

"Real-time-PCR-PIK3CA-5R"

по ТУ 21.20.23-007-57201404-2021

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2023/19368 от 20.01.2023

Содержание

Введение	3
1 Назначение набора	3
2 Характеристика набора	4
2.1 Варианты исполнения	4
2.2 Состав набора реагентов	4
2.3 Число анализируемых проб	5
2.4 Принцип действия набора	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора	6
3.1 Предел обнаружения	6
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ	6
3.3 Характеристики аналитической эффективности	7
3.4 Диагностическая специфичность	7
3.5 Диагностическая чувствительность	7
3.6 Ограничения при применении	8
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа	8
4 Риски, связанные с применением набора реагентов	8
5 Меры предосторожности	9
6 Оборудование и материалы	10
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	10
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	11
7 Анализируемые пробы	11
8 Подготовка компонентов для анализа	12
8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой	12
8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений	12
9 Проведение анализа	13
9.1 Постановка контрольной ПЦР	13
9.2 Программирование и запуск термоциклера	15
9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР	15
9.4 Постановка контрольной ПЦР и аллель-специфичных ПЦР на мутации гена <i>PIK3CA</i>	16
9.5 Программирование и запуск термоциклера	18
10 Анализ результатов	18
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР	18
10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена <i>PIK3CA</i>	20

11	Условия хранения, транспортирования и эксплуатации.....	21
11.1	Условия хранения.....	21
11.2	Условия транспортирования	21
11.3	Условия эксплуатации	21
12	Гарантийные обязательства	22
13	Маркировка	22
	Библиография.....	23
	Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков	24
	Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel».....	25

Введение

Фосфатидилинозитол-3-киназа PI3K является компонентом сигнального каскада PI3K/AKT/mTOR, контролирующего пролиферацию, дифференциацию, миграцию и выживание клеток. Ген *PIK3CA* кодирует каталитическую субъединицу PI3K. Активирующие соматические мутации гена *PIK3CA* часто встречаются в опухолях при раке молочной железы (РМЖ) и колоректальном раке [1; 2; 3].

Активирующие мутации гена *PIK3CA* обнаруживаются в 40% случаев гормонозависимого HER2-отрицательного рака молочной железы. Большинство мутаций в гене *PIK3CA* локализовано в экзоне 9 (E542K, E545K) и в экзоне 20 (H1047R и H1047L). Пациентам с мутациями гена *PIK3CA* рекомендована таргетная терапия селективным ингибитором альфа-изоформы PI3K (алпелисиб) [4; 5].

В соответствии с клиническими рекомендациями «Рак молочной железы» пациентам с распространенным гормонозависимым HER-2-отрицательным раком молочной железы целесообразно определение мутаций в гене *PIK3CA* для принятия решения о назначении комбинации алпелисиба с фулвестрантом [6].

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения соматических мутаций E542K, E545K, H1047R и H1047L гена *PIK3CA* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Функциональное назначение: сопутствующая диагностика, определение показаний к таргетной терапии ингибитором PI3K (комбинации алпелисиба с фулвестрантом) у пациентов с распространенным гормонозависимым HER-2-отрицательным раком молочной железы. Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутаций гена *PIK3CA* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-PIK3CA-5R" по ТУ 21.20.23-007-57201404-2020» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-PIK3CA-5R (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-PIK3CA-5R (36)".

2.2 Состав набора реагентов

Набор содержит пробирки с реагентами (таблица 1), инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 12 реакций	на 36 реакций
1	Зеленый	Контрольная ПЦР-смесь ¹	740 мкл	2*1100 мкл
2	Жёлтый	ПЦР-смесь E542K ¹	280 мкл	840 мкл
3	Жёлтый	ПЦР-смесь E545K ¹	280 мкл	840 мкл
4	Жёлтый	ПЦР-смесь H1047R ¹	280 мкл	840 мкл
5	Жёлтый	ПЦР-смесь H1047L ¹	280 мкл	840 мкл
6	Синий	Тaq ДНК-полимераза	30 мкл	80 мкл
7	Красный	ПКО ²	120 мкл	360 мкл
8	Белый	ОКО ³	1400 мкл	4000 мкл
9	Бесцветный	10x UDG буфер	36 мкл	110 мкл
10	Бесцветный	UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	9 мкл	27 мкл

1) ПЦР-смеси не содержат Таq ДНК-полимеразу.

2) ПКО – положительный контрольный образец, содержащий смесь ДНК с фрагментами гена *PIK3CA* с мутациями E542K, E545K, H1047R, H1047L и ДНК человека без мутаций гена *PIK3CA*;

3) ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

2.3 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-PIK3CA-5R (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в дублях).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-PIK3CA-5R (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) или 16 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в дублях).

2.4 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов.

Набор содержит пять смесей для ПЦР (таблица 1): контрольная ПЦР-смесь и четыре ПЦР-смеси для амплификации фрагментов гена *PIK3CA* с мутациями E542K, E545K, H1047R и H1047L. ПЦР-смеси содержат все необходимые реагенты за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

Для контроля работы набора в его состав входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит смесь ДНК рекомбинантных плазмид с фрагментами гена *PIK3CA* с мутациями E542K, E545K, H1047R, H1047L и ДНК человека без мутаций в 542-м, 545-м и 1047-м кодонах гена *PIK3CA*. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в дублях.

Анализ на наличие мутации в гене *PIK3CA* состоит из двух этапов:

- 1) проверка образцов ДНК в контрольной ПЦР;
- 2) ПЦР на наличие мутаций в гене *PIK3CA*.

На первом этапе проводят ПЦР с контрольной смесью для оценки пригодности и выбора подходящего разведения образцов ДНК. Мишенью для контрольной ПЦР является константный участок ДНК гена *BRAF*. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM. Контрольная ПЦР-смесь также содержит реагенты для ПЦР внутреннего контроля (ВК). Мишенью ПЦР ВК является синтетическая последовательность, не имеющая гомологии с геномом человека. Продукты ПЦР ВК детектируют в 5'-

эксонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX. Амплификация ВК служит контролем правильности постановки и отсутствия ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

Пригодность образца ДНК оценивают по величине C_t , соответствующей количеству циклов ПЦР, при котором кривая флуоресценции пересекает заданный пороговый уровень. Значения C_t разведений клинических образцов ДНК сравнивают с C_t ПКО. Для последующих аллель-специфичных ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину C_t относительно C_t ПКО.

На втором этапе выбранные разведения образцов ДНК анализируют одновременно ещё раз в контрольной ПЦР и в четырёх аллель-специфичных ПЦР на соответствующие мутации. В каждой из аллель-специфичных ПЦР происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК гена *PIK3CA*, содержащего мутацию, за счёт использования праймера, который комплементарен последовательности ДНК с соответствующей мутацией. Продукты ПЦР гена *PIK3CA* детектируют в 5'-эксонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM.

В аллель-специфичной реакции величина C_t для образцов ДНК, содержащих ген *PIK3CA* без мутации, на несколько циклов выше, чем величина C_t , для образцов ДНК, содержащих ген *PIK3CA* с соответствующей мутацией. Наличие мутации в образце ДНК определяется по разнице между значениями C_t в аллель-специфичной ПЦР на соответствующую мутацию и в контрольной ПЦР.

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией E542K гена *PIK3CA* на фоне ДНК гена *PIK3CA* без мутаций, 5% ДНК с мутацией E545K гена *PIK3CA* на фоне ДНК гена *PIK3CA* без мутаций, 5% ДНК с мутацией H1047R гена *PIK3CA* на фоне ДНК гена *PIK3CA* без мутаций и 5% ДНК с мутацией H1047L гена *PIK3CA* на фоне ДНК гена *PIK3CA* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 60 мкл с концентрацией 0,2 нг/мкл (60 копий гена *PIK3CA* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутаций E542K, E545K, H1047R, H1047L в гене *PIK3CA* на фоне ДНК гена *PIK3CA* без мутаций, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных

образцах. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *PIK3CA* без мутаций E542K, E545K, H1047R, H1047L.

Аналитическая специфичность целевых участков гена *PIK3CA* подтверждена *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Различное содержание парафина на срезе (от 48% до 82%) не влияет на результаты определения мутаций гена *PIK3CA*. Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутаций гена *PIK3CA*.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций E542K, E545K, H1047R, H1047L гена *PIK3CA*. Значение повторяемости результатов при определении мутаций E542K, E545K, H1047R и H1047L гена *PIK3CA* составило 100% (интервал 94,04-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций E542K, E545K, H1047R, H1047L гена *PIK3CA*. Значение воспроизводимости результатов при определении при определении мутаций E542K, E545K, H1047R и H1047L гена *PIK3CA* составило 100% (интервал 94,04-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций E542K, E545K, H1047R, H1047L гена *PIK3CA* в клинических испытаниях на выборке из 83 образцов составила 100% (интервал 93,63-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций E542K, E545K, H1047R, H1047L гена *PIK3CA* в клинических испытаниях на выборке из 83 образцов составила 100% (интервал 87,23-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *PIK3CA* оценивается по значению C_t в контрольной ПЦР. Если в этой реакции величина C_t образца превышает допустимые значения, то концентрация ДНК не достаточна, и результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *PIK3CA* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют.

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

1. Недостаточное количество клеток опухолевой ткани на срезе из-за несоблюдения рекомендаций по выделению ДНК из парафиновых блоков (возможный вред: ложноотрицательный результат).
2. Дегградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инактивация фермента Taq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).
3. Снижение чувствительности анализа из-за пропуска этапа обработки образцов ДНК урацил-ДНК-гликозилазой (возможный вред: отсутствие результата, ложноотрицательный результат).
4. Тестирование образцов ДНК без дублей, образец ДНК не добавлен в ПЦР-смесь из-за ошибки (возможный вред: отсутствие результата, ложноотрицательный результат).
5. Интерпретация не валидных результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат, ложноположительный результат).

6. Смещение сигналов флуоресценции из-за использования неверного значения для порогового уровня флуоресценции при анализе данных ПЦР (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
7. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
8. При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
9. Использовать только ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой, входящую в состав набора реагентов.
10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
12. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

13. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
15. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21. **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.
16. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Вортекс персональный V-1 plus (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия) или аналогичное оборудование.

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат типа "Драй-блок" TDB-120 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: «С1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT ХМ-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия) или аналогичный.

Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 0,6 мл и 1,5 мл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки, зарегистрированный в РФ (например, «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, ООО «Номотек», Россия).

Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные («ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия) или аналогичные.

Пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 штук или плашки для ПЦР на 96 лунок («Корнинг Инк.», США) или аналогичные.

Штатив для пробирок, 80 ячеек и/или штатив для пробирок, 96 ячеек («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из фиксированной формалином и заключенной в парафин (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) опухолевой ткани.

Для выделения ДНК из срезов FFPE тканей используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов, рекомендуемый набор: «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, РЗН 2019/9172 от 14.04.2020. Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков приведены в приложении А.

ВНИМАНИЕ! Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Выделенные образцы ДНК хранить с соблюдением условий согласно требованиям инструкции используемого набора для выделения ДНК и с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

8 Подготовка компонентов для анализа

8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой

Обработка урацил-ДНК-гликозилазой образцов ДНК, выделенных из FFPE опухолевой ткани, улучшает чувствительность и специфичность анализа на наличие соматических мутаций.

8.1.1 Разморозить 10x UDG буфер и образцы ДНК, перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 3 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.1.2 Приготовить UDG-смесь: добавить в пробирку объёмом 1,5 мл реагенты (ОКО, 10x UDG буфер и UDG) и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Количество реагентов в расчёте на один образец приведено в таблице 2, для обработки N образцов указанное количество необходимо умножить на (N+1).

Таблица 2. Состав UDG-смеси

Реагент	Количество на 1 образец ДНК
ОКО	5 мкл
10x UDG буфер	4 мкл
UDG (Урацил-ДНК-гликозилаза)	1 мкл

8.1.3 Добавить в пробирки объёмом 1,5 мл по 10 мкл UDG-смеси, по 40 мкл образцов ДНК и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Центрифугировать в течение 3 секунд на микроцентрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.1.4 Поместить пробирки в термостат и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C. После этого прогреть в течение 5 минут при температуре 95°C, чтобы инактивировать UDG и центрифугировать в течение 3 секунд. ДНК, обработанную UDG, хранить не более суток при температуре 4°C или в течение 6 месяцев при температуре минус 20°C.

8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений

Необходимая степень разведения образцов ДНК зависит от количества ткани, взятой для выделения ДНК и от концентрации ингибирующих примесей. При

использовании рекомендаций по выделению ДНК (Приложение А) для большинства образцов достаточно разведение в 5-20 раз, поэтому сначала рекомендуется тестировать все образцы в разведениях 1/5 и 1/20.

8.2.1 Приготовить две микропробирки объёмом 1,5 мл для каждого образца ДНК. Промаркировать пробирки «1/5» и «1/20» соответственно.

8.2.2 В каждую пробирку добавить ОКО и образец ДНК согласно таблице 3.

Таблица 3. Разведение образцов ДНК

Разведение	Количество ДНК	Количество ОКО
1/5	30 мкл	120 мкл
1/20	10 мкл	190 мкл

8.2.3 Перемешать на вортексе в течение 2-3 сек, центрифугировать в течение 5-10 секунд, чтобы собрать жидкость на дне пробирок. Разведенную ДНК хранить не более суток при температуре 4°C или не более 6 месяцев при температуре минус 20°C.

9 Проведение анализа

9.1 Постановка контрольной ПЦР

9.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух разведениях в дублях указанное количество необходимо умножить на $(4N + 5)$.

Таблица 4. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,2 мкл

9.1.2 Контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПКО (пробирка №7, красная крышка) и ОКО (пробирка №8, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что раствор полностью растаял. Содержимое пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки.

9.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 9.1.1): внести в пробирку расчётное количество контрольной ПЦР-смеси, добавить Taq ДНК-полимеразу и тщательно перемешать пипетированием (не использовать вортекс). Реакционная смесь готова.

ВНИМАНИЕ! Использовать ПЦР-смесь немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

9.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать крышки пробирок!

Пример расположения шести клинических образцов ДНК и контрольных образцов в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведён на рисунке 1.

Разведение	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
1:5	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
1:20	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		
	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		

Рисунок 1. Схема расположения шести образцов ДНК в двух разведениях в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок.

Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО и разведение (1:5; 1:20).

9.1.5 Добавить в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой и закрыть крышки.

9.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

9.1.7 Закрывать крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.2 Программирование и запуск термоциклера

9.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 9.2.2-9.2.4.

9.2.2 Задать объем реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	5 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	40 сек	
40	Денатурация	95°C	20 сек	Да
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	1 мин	

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации ДНК ВК;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагментов генов *PIK3CA* и *BRAF*.

9.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.2.5 Запустить протокол ПЦР.

9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР

9.3.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин Ct использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый уровень 200.

Примечание: экспоненциальная фаза соответствует линейному участку на графике кривой флуоресценции в логарифмической шкале.

9.3.2 Проверить значения Ct по каналам FAM для ПКО и ОКО (таблица 6, допустимые значения Ct в контрольной ПЦР). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *PIK3CA* только в том случае, если величины Ct для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

- для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение Ct_{ROX} меньше или равно QC_{ROX} ;

- для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение Ct_{FAM} либо Ct_{FAM} больше $Ct_{ПКО}+6$ ($Ct_{ПКО}$ – это Ct ПКО в контрольной ПЦР);
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $Ct_{ПКО}$ меньше или равно QC_{FAM} (контрольная ПЦР).

Значения QC_{ROX} и QC_{FAM} указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте. Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ.

9.3.3 Сравнить значения Ct по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов (Ct_C) и Ct ПКО ($Ct_{ПКО}$). Для проведения аллель-специфичной ПЦР выбрать разведение образца, имеющее значение Ct_C , наиболее близкое к $Ct_{ПКО}$.

9.3.4 Если значение Ct_C определяется в диапазоне $Ct_{ПКО}-4 \leq Ct_C \leq Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *PIK3CA*.

9.3.5 Если значение Ct_C меньше $Ct_{ПКО}-4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Ct на 1 цикл, и повторить анализ.

9.3.6 Если значение Ct_C больше $Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

9.4 Постановка контрольной ПЦР и аллель-специфичных ПЦР на мутации гена *PIK3CA*

9.4.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ОКО и ПКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на $(2N + 5)$.

9.4.2 Разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПЦР-смесь E542K (пробирка №2, жёлтая крышка), ПЦР-смесь E545K (пробирка №3, жёлтая крышка), ПЦР-смесь H1047R (пробирка №4, жёлтая крышка), ПЦР-смесь H1047L (пробирка №5, жёлтая крышка), ПКО и ОКО. Убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.4.3 Промаркировать пять чистых пробирок объёмом 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 контрольную ПЦР-смесь, в пробирку №2 – ПЦР-смесь E542K, в пробирку №3 – ПЦР-смесь E545K, в пробирку №4 – ПЦР-смесь H1047R, в пробирку №5 – ПЦР-смесь H1047L. Добавить в каждую пробирку для реакционных

смесей Taq ДНК-полимеразу. Перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс) и центрифугировать 5 сек в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходных ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы немедленно поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

9.4.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 2.

ПЦР-смесь	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
Контрольная	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
E542K	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
E545K	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
H1047R	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
H1047L	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО

Рисунок 2. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок.

Указаны ПЦР-смеси, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

9.4.5 Добавить в стрипы по 20 мкл реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

9.4.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл разведённых клинических образцов ДНК, используя оптимальные разведения, определённые на этапе контрольной ПЦР;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

9.4.7 Закрывать крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.4.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.4.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.5 Программирование и запуск термоциклера

9.5.1 Программирование и запуск прибора проводить в соответствии с руководством по эксплуатации, п. 9.2.2-9.2.4 и таблицей 5.

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для получения величин C_t использовать логарифмическую шкалу графика флуоресценции и выставить пороговый уровень 200 как описано в разделе 9.3.1.

10.1.2 Проверить значения C_t по каналам ROX и FAM последовательно для ОКО, ПКО и клинических образцов ДНК.

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *PIK3CA* только в том случае, если величины C_t для ОКО и ПКО имеют допустимые значения (таблица 6):

– для ОКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение $C_{t_{ROX}}$ меньше или равно QC_{ROX} ;

– для ОКО во всех аллель-специфичных ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение $C_{t_{FAM}}$ либо $C_{t_{FAM}}$ больше $C_{t_{ПКО}}+6$ ($C_{t_{ПКО}}$ – значение C_t ПКО в ПЦР с этой же смесью);

– для ПКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $C_{t_{ПКО}}$ меньше или равно значению QC_{FAM} для контрольной ПЦР;

– для ПКО во всех аллель-специфичных ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяются значения $C_{t_{ПКО}}$ меньше или равные значениям QC_{FAM} для этих ПЦР-смесей.

Таблица 6. Допустимые значения Ct для контрольных образцов

ПЦР	Допустимое значение Ct для образца	
	ОКО	ПКО
Контрольная ПЦР	$Ct_{ROX} \leq QC_{ROX}^1$ Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}^2 + 6$	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР) ¹
ПЦР на мутацию E542K	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}^2 + 6$	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР E542K) ¹
ПЦР на мутацию E545K	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}^2 + 6$	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР E545K) ¹
ПЦР на мутацию H1047R	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}^2 + 6$	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР H1047R) ¹
ПЦР на мутацию H1047L	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}^2 + 6$	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР H1047L) ¹

1) Значение QC_{ROX} и значения QC_{FAM} для контрольной ПЦР и для аллель-специфичных ПЦР указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте.

2) $Ct_{ПКО}$ – значение Ct ПКО в этой же постановке ПЦР.

10.1.4 Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения Ct не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 7.

 Таблица 7. Другие значения Ct для контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	Значение Ct	Возможные проблемы
Контрольная ПЦР		
ОКО	$Ct_{ROX} > QC_{ROX}$	Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
	$Ct_{FAM} \leq Ct_{ПКО} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО	$Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.
ПЦР на мутации E542K, E545K, H1047R, H1047L		
ОКО	$Ct_{FAM} \leq Ct_{ПКО} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО	$Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (ПЦР E542K) $Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (ПЦР E545K) $Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (ПЦР H1047R) $Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (ПЦР H1047L)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

10.1.5 Для каждого клинического образца в контрольной ПЦР должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяться значение C_t (C_{tC}).

10.1.6 Если значение C_{tC} определяется в диапазоне $C_{tПКО}-4 \leq C_{tC} \leq C_{tПКО}+4$, то концентрация ДНК достаточна для анализа на наличие мутаций гена *PIK3CA*.

10.1.7 Если значение C_{tC} меньше $C_{tПКО}-4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает C_t на 1 цикл, и повторить анализ.

10.1.8 Если значение C_{tC} больше $C_{tПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *PIK3CA*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена *PIK3CA*

10.2.1 Для каждого клинического образца для каждой мутации рассчитать значения $\Delta C_t = C_{tAS} - C_{tC}$, где $C_{tAS} - C_t$ образца в аллель-специфичной ПЦР, соответствующей мутации, $C_{tC} - C_t$ образца в контрольной ПЦР. Рекомендации по расчёту ΔC_t в программе «MS Office Excel» приведены в приложении Б.

10.2.2 Сравнить полученные значения ΔC_t клинического образца ДНК со значениями точек отсечения (ТО) для каждой мутации. Значения ТО для каждой мутации указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте.

10.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в гене *PIK3CA*), если для обеих дублей значения ΔC_t меньше или равны значению ТО для этой мутации.

10.2.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию в гене *PIK3CA* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обеих дублей значения ΔC_t больше ТО, или если в аллель-специфичной ПЦР значения C_{tAS} образца не определены или для одного из дублей значение ΔC_t больше ТО, а для другого – значение C_{tAS} не определено.

10.2.5 Если для одного из дублей значение ΔC_t меньше или равно ТО, а для другого ΔC_t больше ТО, то результат считают сомнительным и анализ повторяют. Если в повторном анализе получают сомнительный результат, то проводят макродиссекцию участков опухоли из срезов FFPE опухолевой ткани так, чтобы содержание опухолевых клеток было не менее 50%, выделяют ДНК и повторяют анализ.

11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

11.1 Условия хранения

11.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°C до минус 25°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

11.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°C – не более 30 минут.

11.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°C.

11.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

11.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 12).

11.3 Условия эксплуатации

11.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°C до 25°C).

11.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

12 Гарантийные обязательства

12.1 Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

12.2 Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

12.3 В случае нарушения условий транспортирования, обнаружения повреждений упаковки, а также по вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обратиться к производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
 Телефон: +7 (383) 209-32-40
 Электронная почта: info@biolinklab.ru
 Веб-сайт: biolinklab.ru

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические СИМВОЛЫ.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Изготовитель

Библиография

1. High frequency of mutations of the *PIK3CA* gene in human cancers. / Y. Samuels, Z. Wang, A. Bardelli, et al. // Science. – 2004. – Vol. 304 (5670). – P. 554. – DOI: 10.1126/science.1096502.
2. The *PIK3CA* gene is mutated with high frequency in human breast cancers. / K. E. Bachman, P. Argani, Y. Samuels, et al. // Cancer Biol Ther. – 2004. – Vol. 3 (8). – P. 772-775. – DOI: 10.4161/cbt.3.8.994
3. Mutation of the *PIK3CA* oncogene in human cancers. / B. Karakas, K. E. Bachman, B. H. Park // Br J Cancer. – 2006. – Vol. 94 (4). – P. 455-459. – DOI: 10.1038/sj.bjc.6602970
4. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. / F. André, E. Ciruelos, G. Rubovszky, et al. // N Engl J Med. – 2019. – Vol. 380 (20). – P. 1929-1940. – DOI: 10.1056/NEJMoa1813904
5. The Predictive Role of *PIK3CA* Mutation Status on PI3K Inhibitors in HR+ Breast Cancer Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. / M. Wang, J. Li, J. Huang, M. Luo. // Biomed Res Int. – 2020. – Vol. 2020: 1598037. – DOI: 10.1155/2020/1598037
6. Клинические рекомендации. Рак молочной железы. / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество онкомаммологов» // Год утверждения (частота пересмотра): 2021. – 127 с. Одобрено на заседании научно-практического совета Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол от 25.12.2020 № 17-4/4884).

Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков

Для выделения ДНК из FFPE блоков излишки парафина обрезать скальпелем и приготовить серийные срезы толщиной 5 микрон с площадью ткани на срезе 25-80 мм². Если поверхность блока была длительное время экспонирована на воздухе, то первые 2-3 среза отбросить, а последующие пять использовать для выделения ДНК.

Первый или последний рабочие срезы серии окрасить гематоксилин-эозином, после чего патоморфолог оценивает процент опухолевых клеток. Если на срезе менее 30% опухолевых клеток, то провести макродиссекцию. Рабочие срезы поместить в пробирку объёмом 1,5 мл и выделить ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК из FFPE ткани, зарегистрированного на территории РФ.

Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Для удобства анализа экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». На рисунке Б1 приведён пример расчёта ΔCt для мутаций E542K и E545K, для других мутаций обработка результатов проводится аналогично.

В столбце «Target» ввести «Контроль» в ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, ввести названия ПЦР-смесей в ячейки, соответствующие ПЦР с этими смесями (рисунок Б1, элемент 1). При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новый столбец « Ct_C », где Ct_C – Ct образца в контрольной ПЦР (рисунок Б1, элемент 4). Значения Ct в контрольной ПЦР скопировать в столбце « Cq » (рисунок Б1, элемент 3) и вставить в столбец « Ct_C » (рисунок Б1, элемент 4), таким образом, чтобы значения Cq и Ct_C для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец « ΔCt ». Используя функцию вычитания, для каждого образца для каждой мутации рассчитать разницу $\Delta Ct = Cq - Ct_C$ (рисунок Б1, элемент 5), что соответствует $\Delta Ct = Ct_{AS} - Ct_C$.

Добавить столбец «ТО», внести значения ТО для каждой мутации, указанные на упаковке набора (рисунок Б1, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значениями ТО для каждой мутации и записать результат (рисунок Б1, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в гене *PIK3CA*), если для обеих дублей значения ΔCt меньше или равны значению ТО для этой мутации.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию в гене *PIK3CA* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обеих дублей значения ΔCt больше ТО или значения Ct_{AS} не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше ТО, а для другого – значение Ct_{AS} не определено.

Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно ТО, а для другого ΔCt больше ТО, то результат считают сомнительным, необходимо повторить анализ.

1 Target	Content	2 Sample	3 Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	4 CtC	5 ΔCt	6 TO	7 Результат
контроль	Unkn-01	ДНК1	15,6	15,6	0,0				
контроль	Unkn-01	ДНК1	15,6	15,6	0,0				
контроль	Unkn-02	ДНК2	23,2	23,4	0,4				
контроль	Unkn-02	ДНК2	23,7	23,4	0,4				
контроль	Unkn-03	ДНК3	23,2	23,2	0,0				
контроль	Unkn-03	ДНК3	23,3	23,2	0,0				
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0,0	0,0				
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0,0	0,0				
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	19,1	19,0	0,2				
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	18,9	19,0	0,2				
E542K	NTC-02	ОКО	nd	0,0	0,0				
E542K	NTC-02	ОКО	nd	0,0	0,0				
E542K	Unkn-01	ДНК1	27,0	28,1	1,5	15,6	11,4	5,9	отрицательный
E542K	Unkn-01	ДНК1	29,1	28,7	1,5	15,6	13,5	5,9	отрицательный
E542K	Unkn-02	ДНК2	28,0	27,7	0,4	23,2	4,8	5,9	положительный
E542K	Unkn-02	ДНК2	27,5	27,7	0,4	23,7	3,7	5,9	положительный
E542K	Unkn-03	ДНК3	nd	0,0	0,0	23,2	#ЗНАЧ!	5,9	отрицательный
E542K	Unkn-03	ДНК3	nd	0,0	0,0	23,3	#ЗНАЧ!	5,9	отрицательный
E542K	Pos Ctrl-02	ПКО	23,9	24,0	0,1				
E542K	Pos Ctrl-02	ПКО	24,0	24,0	0,1				
E545K	NTC-03	ОКО	nd	0,0	0,0				
E545K	NTC-03	ОКО	nd	0,0	0,0				
E545K	Unkn-01	ДНК1	26,5	26,4	0,1	15,6	10,9	5,1	отрицательный
E545K	Unkn-01	ДНК1	26,4	26,4	0,1	15,6	10,7	5,1	отрицательный
E545K	Unkn-02	ДНК2	nd	0,0	0,0	23,2	#ЗНАЧ!	5,1	отрицательный
E545K	Unkn-02	ДНК2	38,4	38,4	0,0	23,7	14,7	5,1	отрицательный
E545K	Unkn-03	ДНК3	25,4	25,4	0,1	23,2	2,2	5,1	положительный
E545K	Unkn-03	ДНК3	25,3	25,4	0,1	23,3	2,0	5,1	положительный
E545K	Pos Ctrl-03	ПКО	21,8	21,9	0,2				
E545K	Pos Ctrl-03	ПКО	22,1	21,9	0,2				

Рисунок Б1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

1 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, с ПЦР-смесью E542K и с ПЦР-смесью E545K.

2 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

3 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct образцов в контрольной ПЦР.

4 – столбец «CtC», в который вставлены значения Ct из столбца «Cq».

5 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Cq - Ct_c$.

6 – значения TO для мутаций E542K и E545K (указаны на упаковке набора и в паспорте).

7 – результат анализа на наличие мутаций в гене *PIK3CA*.

Cq Mean – среднее значение Cq для образца,

Cq Std. Dev – среднеквадратическое отклонение значения Cq для образца.

Значения Cq Mean и Cq Std. Dev не используются при расчётах.

nd – значение не определено, #ЗНАЧ! – ошибка в значении.

В приведённом на рисунке Б1 примере $TO_{E542K} = 5,9$, $TO_{E545K} = 5,1$.

Образец ДНК1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутаций E542K и E545K в гене *PIK3CA* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью E542K значения ΔCt составляют 11,5 и 13,4 (больше $TO = 5,9$), а в ПЦР со смесью E545K значения ΔCt составляют 10,9 и 10,7 (больше $TO = 5,1$).

Образец ДНК2 учитывается как положительный, содержащий мутацию E542K в гене *PIK3CA*, так как в ПЦР со смесью E542K значения ΔCt составляют 4,8 и 3,7, для обоих дублей меньше значения $TO = 5,9$.

Образец ДНК3 учитывается как положительный, содержащий мутацию E545K в гене *PIK3CA*, так как в ПЦР со смесью E545K значения ΔCt составляют 2,2 и 2,0, для обоих дублей меньше значения $TO = 5,1$.

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru