



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БиоЛинк»

Корниенко А. А.



Набор реагентов для диагностики *in vitro*  
для выявления мутации V600E в гене *BRAF*  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

в режиме реального времени

**"Real-time-PCR-BRAF-V600E"**

по ТУ 21.20.23-001-57201404-2019

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

Регистрационное удостоверение

№ РЗН 2021/13521 от 20.02.2021







## Содержание

Введение .....	3
Варианты исполнения .....	3
1 Назначение набора .....	3
2 Характеристика набора.....	4
2.1 Состав набора реагентов .....	4
2.2 Число анализируемых проб.....	4
2.3 Принцип действия набора .....	4
3 Аналитические и диагностические характеристики набора.....	6
3.1 Предел обнаружения.....	6
3.2 Аналитическая специфичность.....	6
3.3 Влияние интерферирующих веществ .....	6
3.4 Характеристики аналитической эффективности .....	6
3.5 Диагностическая специфичность .....	7
3.6 Диагностическая чувствительность .....	7
3.7 Ограничения при применении .....	7
4 Меры предосторожности.....	8
5 Оборудование и материалы.....	9
5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов .....	9
5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов.....	10
6 Анализируемые пробы.....	10
7 Подготовка компонентов для анализа .....	11
7.1 Подготовка реагентов .....	11
7.2 Подготовка образцов (приготовление разведений).....	11
8 Проведение анализа .....	12
8.1 Приготовление смеси для контрольной ПЦР.....	12
8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96 .....	13
8.3 Анализ результатов контрольной ПЦР .....	14
8.4 Приготовление смесей для контрольной и аллель-специфичной ПЦР .....	15
8.5 Программирование и запуск термоциклера CFX96 .....	16
9 Анализ результатов .....	16
9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР.....	16
9.2 Анализ результатов аллель-специфичной ПЦР на наличие мутации V600E в гене BRAF.....	18

10	Условия хранения, транспортирования и эксплуатации.....	20
10.1	Условия хранения.....	20
10.2	Условия транспортирования .....	20
10.3	Условия эксплуатации .....	20
11	Гарантийные обязательства .....	21
12	Маркировка .....	21
	Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков .....	22
	Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel».....	23
	Библиография.....	25

## Введение

Ген *BRAF* кодирует внутриклеточный белок – компонент сигнальных каскадов RAS-МАРК и RAS-МЕК-ERK, контролирующих пролиферацию и дифференциацию клеток в ответ на внешние митогенные стимулы. Белок BRAF обладает киназной активностью, необходимой для передачи сигнала при его активации.

Соматические активирующие мутации в гене *BRAF* часто встречаются при меланоме кожи, опухолях щитовидной железы, раке яичников, раке толстой и прямой кишки [1]. Наиболее частой активирующей мутацией гена *BRAF* является точечная нуклеотидная замена 1799T>A, которая соответствует замене валина на глутаминовую кислоту в позиции 600 (V600E) в белке BRAF [2]. Опухоли меланомы с мутациями кодона V600 чувствительны к лекарственным препаратам на основе ингибиторов киназной активности BRAF (вемурафениб, дабрафениб) [3-6]. Тестирование на наличие мутаций BRAF V600 рекомендуется для выбора терапии при метастазирующей меланоме кожи [7,8].

## Варианты исполнения

«Набор реагентов для диагностики *in vitro* для выявления мутации V600E в гене *BRAF* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-BRAF-V600E" по ТУ 21.20.23-001-57201404-2019» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-BRAF-V600E (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-BRAF-V600E (36)".

## 1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутации V600E гена *BRAF* методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени у пациентов с меланомой для подбора противоопухолевой терапии с использованием вемурафениба или дабрафениба. Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани. Для проведения ПЦР используется медицинское изделие «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями» исполнения: «C1000 Touch» в комплекте с «Модуль реакционный оптический CFX96 (Optical Reaction Module CFX96)» (Перечисление 5), производства «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США, РУ – ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

## 2 Характеристика набора

### 2.1 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 <sup>1)</sup>	740 мкл	2×1100 мкл
2	Желтый	ПЦР-смесь BRAF-V600mut <sup>1)</sup>	280 мкл	840 мкл
3	Синий	Тaq ДНК-полимераза	25 мкл	50 мкл
4	Красный	ПКО <sup>2)</sup>	65 мкл	190 мкл
5	Белый	ОКО <sup>3)</sup>	1,4 мл	4 мл

<sup>1)</sup> ПЦР-смесь не содержит Таq ДНК-полимеразу.

<sup>2)</sup> Положительный контрольный образец (ПКО) содержит смесь ДНК рекомбинантных плазмид с фрагментом гена *BRAF* с мутацией V600E и с фрагментом гена *BRAF* без мутаций.

<sup>3)</sup> Отрицательный контрольный образец (ОКО) содержит воду без нуклеаз.

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

### 2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-BRAF-V600E (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в двух повторях).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-BRAF-V600E (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 двух повторях) или 16 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в двух повторях).

### 2.3 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью ТаqMan зондов [9].

В аллель-специфичной ПЦР происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК, содержащего мутацию V600E, за счёт использования праймера, который комплементарен последовательности ДНК с мутацией [10].

Набор реагентов содержит две смеси: контрольная ПЦР-смесь для амплификации константного фрагмента гена *BRAF* и ПЦР-смесь BRAF-V600mut для амплификации фрагмента гена *BRAF* с мутацией V600E. Продукты ПЦР гена *BRAF* детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM.

Обе смеси также содержат реагенты для ПЦР внутреннего контроля (ВК). Мишенью ПЦР ВК является синтетическая последовательность, не имеющая гомологии с геномом человека. Продукты ПЦР ВК детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX. Амплификация ВК служит контролем правильности постановки и отсутствия ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

ПЦР-смеси состоят из всех необходимых реагентов 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, несущих фрагмент гена *BRAF* с мутацией V600E и фрагмент гена *BRAF* без мутации. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в двух повторах.

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

- 1) контрольная ПЦР;
- 2) аллель-специфичная ПЦР.

На первом этапе проводят ПЦР с контрольной смесью для оценки качества образцов и выбора подходящего разведения образцов ДНК. Пригодность образца ДНК оценивают по величине Ct, соответствующей количеству циклов ПЦР, при котором кривая флуоресценции пересекает заданный пороговый уровень. Ct разведений клинических образцов ДНК сравнивают с Ct ПКО. Для последующей аллель-специфичной ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину Ct относительно Ct ПКО.

На втором этапе ДНК с выбранными разведениями анализируют одновременно ещё раз в контрольной ПЦР и в аллель-специфичной ПЦР. В аллель-специфичной реакции величина Ct для образцов ДНК, содержащих ген *BRAF* дикого типа, на несколько циклов больше, чем величина Ct, для образцов ДНК, содержащих ген *BRAF* с мутацией V600E.

### 3 Аналитические и диагностические характеристики набора

#### 3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией V600E гена *BRAF* на фоне ДНК дикого типа.

#### 3.2 Аналитическая специфичность

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутации V600E в гене *BRAF* человека, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *BRAF* без мутации в 600 кодоне, и для образцов ДНК, несущих ген *BRAF* с мутацией V600K, влияние других мутаций в кодоне V600 не изучено.

#### 3.3 Влияние интерферирующих веществ

Потенциально интерферирующие вещества не влияют на способность набора реагентов определять мутацию V600E гена *BRAF* в следующих концентрациях: гемоглобин – 5 мкг/мл, парафин гистологический – 5%, этанол – 5%, орто-ксилол – 5%.

Растворы, входящие в состав набора реагентов «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*», не влияют на способность определять мутацию V600E гена *BRAF* в следующих концентрациях: раствор ДПП (с протеиназой) – 5%, лизирующий раствор М – 5%, связывающий раствор М – 5%, промывочный раствор – 5%.

#### 3.4 Характеристики аналитической эффективности

Правильность оценивали как долю правильных результатов (истинно положительных и истинно отрицательных) среди общего числа проанализированных образцов. Значение правильности 100% (интервал 95,3%-100% с доверительной вероятностью 95%).

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 расхождений в определении мутации V600E гена *BRAF* выявлено не было.

Значение повторяемости 100% (интервал 95,3%-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. По результатам испытаний расхождений в определении мутации V600E гена *BRAF* выявлено не было. Значение воспроизводимости 100% (интервал 95,3%-100% с доверительной вероятностью 95%).

### **3.5 Диагностическая специфичность**

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутации V600E гена *BRAF* в клинических испытаниях на выборке из 75 образцов составила 100% (интервал 95,1%-100% с доверительной вероятностью 95%).

### **3.6 Диагностическая чувствительность**

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутации V600E гена *BRAF* в клинических испытаниях на выборке из 75 образцов составила 100% (интервал 95,1%-100% с доверительной вероятностью 95%).

### **3.7 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 мутации V600E гена *BRAF* оценивается по значению Ct в контрольной ПЦР. Если концентрация ДНК не достаточна, то результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

## 4 Меры предосторожности

- 4.1 Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
- 4.2 Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.
- 4.3 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
- 4.4 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
- 4.5 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.
- 4.6 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- 4.7 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
- 4.8 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.
- 4.9 Использовать только Taq ДНК-полимеразу, входящую в состав набора реагентов.
- 4.10 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
- 4.11 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
- 4.12 Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- 4.13 После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Провести обработку рабочих поверхностей оборудования дезинфицирующими средствами (1% раствор «Мистраль» или аналогичный раствор, зарегистрированный на территории РФ).

4.14 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». **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.

4.15 Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## 5 Оборудование и материалы

### 5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Автоматические дозаторы Discovery Comfort переменного объема («HTL», Польша) на 0,2-2 мкл (кат. № DV2), 0,5-10 мкл (кат. № DV10), 2-20 мкл (кат. № DV20), 10-100 мкл (кат. № DV100), 20-200 мкл (кат. № DV200), 100-1000 мкл (кат. № DV1000) 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.

Мини-центрифуга-вортекс «Микроспин» FV-2400 («SIA BIOSAN», кат. № BS-010201-AAA, Латвия) с ротором R-1.5М для пробирок (кат. № BS-010201-AK) и ротором SR-64 для стрипов (кат. № BS-010201-EK) или аналогичное оборудование.

ПЦР-бокс 2-го класса биологической защиты для работы с ДНК (например, БАВ-ПЦР-Ламинар-С, ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Термостат твердотельный М-208 с диапазоном температур от комнатной до 99°C («БИС-Н», Россия) или аналогичное оборудование.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: «С1000 Touch» в комплекте с «Модуль реакционный оптический CFX96 (Optical Reaction Module CFX96)» (Перечисление 5), производства «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США, РУ – ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016.

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 BioSan LMC-300 («SIA BIOSAN», кат. № BS-010208-AAA, Латвия) с ротором R-2 (кат. № BS-010208-AK) и адаптерами для 96-луночных ПЦР-планшетов (кат. № BS-010219-DK) или аналогичное оборудование.

## 5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

96-луночный штатив для микропробирок 0,5-2,0 мл («компания Хеликон», кат. № RP-80, Россия или аналогичные).

Контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия или аналогичный).

Микроцентрифужные пробирки («Ахуген», США) градуированные объемом 0,6 мл (кат. № МСТ-060-С) и 1,5 мл (кат. № МСТ-150-С) или аналогичные.

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки, зарегистрированный на территории 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, РЗН 2019/9172 от 14.04.2020).

Наконечники универсальные для дозаторов («Ахуген», США) с фильтром объемом 0,5-10 мкл (кат. № TF-300), 20 мкл (кат. № TF-20), 200 мкл (кат. № TF-200) и 1000 мкл (кат. № TF-1000) или аналогичные.

Перчатки медицинские одноразовые неопудренные нитриловые или латексные («Venovy», Малайзия или аналогичные).

Стрипы по 8 пробирок объемом 0,2 мл с крышками («BIOplastics», кат. № K72810B или аналогичные).

Штатив для пробирок объемом 1,5 мл (например, фирма «SSI», США или аналогичный).

## 6 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. В набор не входят реагенты для выделения ДНК.

Для получения ДНК можно использовать зарегистрированные в РФ наборы реагентов для выделения ДНК из срезов FFPE тканей, 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.

## **7 Подготовка компонентов для анализа**

### **7.1 Подготовка реагентов**

Контрольную ПЦР-смесь и ПЦР-смесь BRAF-V600mut, ПКО и ОКО разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 1-2 сек при 1000 об/мин., чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

**ВНИМАНИЕ!** После приготовления смесей для ПЦР немедленно поместить оставшиеся реагенты в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

Не использовать вортекс для Таq ДНК-полимеразы и смесей, содержащих ее, это может привести к инактивации фермента.

**ВНИМАНИЕ!** Помимо клинических образцов ДНК в каждой постановке необходимо использовать ПКО и ОКО, входящие в состав набора реагентов, все образцы тестировать в двух повторах.

### **7.2 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.

Приготовить две микропробирки объемом 1,5 мл для каждого образца ДНК. Промаркировать пробирки «1:5» и «1:20» соответственно. В каждую пробирку добавить ОКО (пробирка №5) и исходный раствор образца ДНК согласно таблице 2. Перемешать на вортексе в течение 2-3 сек, центрифугировать в течение 5-10 сек, чтобы собрать жидкость на дне пробирок. Разведенную ДНК хранить не более 6 месяцев при температуре минус 20°C.

Таблица 2. Разведение образцов ДНК

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

## 8 Проведение анализа

### 8.1 Приготовление смеси для контрольной ПЦР

8.1.1 Рассчитать необходимое количество контрольной 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 3, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух повторях это количество необходимо умножить на  $(4N + 5)$ .

Таблица 3. Количество реагентов на одну реакцию

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

8.1.2 Контрольную ПЦР-смесь, ПКО и ОКО разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объемом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 8.1.1): внести в пробирку расчётное количество контрольной ПЦР-смеси (пробирка №1, зелёная крышка), добавить Taq ДНК-полимеразу (пробирка №3, синяя крышка) 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.

8.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы.

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

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

8.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл ДНК клинических образцов (разведения 1:5 и 1:20);
- 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.

Пример расположения образцов приведен на рисунке 1.

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

Рисунок 1. Пример расположения шести образцов ДНК в двух разведениях и в двух повторах при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны номера образцов ДНК и разведения образцов (1:5; 1:20), ПКО и ОКО.

8.1.7 Легко перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

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

8.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

## 8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96

8.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование проводить в соответствии с руководством по эксплуатации прибора и п. 8.2.2-8.2.4

8.2.2 Задать объем реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Протокол ПЦР в реальном времени для набора реагентов

Количество циклов	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	95°C	5 мин	Нет
10	95°C	20 сек	
	58°C	40 сек	
40	95°C	20 сек	Да
	58°C	1 мин	

8.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации ДНК ВК;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *BRAF*.

8.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

### 8.3 Анализ результатов контрольной ПЦР

8.3.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла ( $C_t$ ) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин  $C_t$  использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый уровень 100.

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

8.3.2 Проверить величины  $C_t$  по каналам FAM и ROX для ПКО и ОКО (таблица 5, раздел таблицы «ПЦР с контрольной смесью»). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутации V600E в гене *BRAF* только в том случае, если величины  $C_t$  для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

- для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение  $C_{tROX}$  меньше или равно  $QC_{ROX}$  (указано на наклейке на упаковке набора);
- для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение  $C_{tFAM}$  либо  $C_{tFAM}$  больше  $C_{tПКО+6}$  ( $C_{tПКО}$  –  $C_t$  ПКО в контрольной ПЦР);
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение  $C_{tПКО}$  меньше или равно  $QC_{FAM}$  (контрольная ПЦР) (указано на наклейке на упаковке набора).

Если величины  $C_t$  контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ.

8.3.3 Сравнить величины  $C_t$  по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов ( $C_{tC}$ ) и  $C_t$  ПКО ( $C_{tПКО}$ ). Для проведения аллель-специфичной ПЦР выбрать разведение образца, имеющее значение  $C_{tC}$ , наиболее близкое к  $C_{tПКО}$ .

8.3.4 Если значение  $C_{tC}$  определяется в диапазоне  $C_{tПКО}-4 \leq C_{tC} \leq C_{tПКО}+4$ , то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутации V600E в гене *BRAF*.

8.3.5 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.

8.3.6 Если значение  $C_{tC}$  больше  $C_{tПКО}+4$ , то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутации V600E в гене *BRAF*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

## 8.4 Приготовление смесей для контрольной и аллель-специфичной ПЦР

8.4.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 3, для тестирования N клинических образцов в двух повторах это количество необходимо умножить на  $(2N + 5)$ .

8.4.2 Контрольную ПЦР-смесь, ПЦР-смесь BRAF-V600mut, ПКО и ОКО разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.4.3 Промаркировать две чистые пробирки объемом на 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зеленая крышка), в пробирку №2 – ПЦР-смесь BRAF-V600mut (пробирка №2, желтая крышка). Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК-полимеразу (пробирка №3, синяя крышка). Перемешать пипетированием 6-8 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 сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

8.4.4 Добавить в стрипы по 20 мкл реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой и закрыть крышки.

8.4.5 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл ДНК клинических образцов, 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.

Пример расположения образцов 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
	К	К	К	К	К	К	К	К
BRAF-V600mut	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	АС	АС	АС	АС	АС	АС	АС	АС
BRAF-V600mut	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	АС	АС	АС	АС	АС	АС	АС	АС

Рисунок 2. Пример расположения шести образцов ДНК в двух повторах при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО и ПЦР-смесь: К – контрольная ПЦР-смесь, АС – ПЦР-смесь BRAF-V600mut

8.4.6 Легко перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

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

8.4.8 Установить стрипы в блок термоциклера.

## 8.5 Программирование и запуск термоциклера CFX96

8.5.1 Программирование и запуск прибора проводить в соответствии с руководством по эксплуатации, п. 8.2.2-8.2.4 и таблицей 4.

## 9 Анализ результатов

### 9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

9.1.1 Для получения величин  $C_t$  использовать логарифмическую шкалу графика флуоресценции и выставить пороговый уровень как описано в разделе 8.3.1.

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

9.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутации V600E в гене *BRAF* только в том случае, если величины  $C_t$  для ПКО и ОКО имеют допустимые значения (таблица 5):

- для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение  $C_{tROX}$  меньше или равно  $QC_{ROX}$  (указано на наклейке на упаковке набора);
- для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение  $C_{tFAM}$  либо  $C_{tFAM}$  больше  $C_{tПКО}+6$  ( $C_{tПКО}$  –  $C_t$  ПКО в контрольной ПЦР);
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение  $C_{tПКО}$  меньше или равно  $QC_{FAM}$  (аллель-специфичная ПЦР) (указано на наклейке на упаковке набора).

Таблица 5. Допустимые значения  $C_t$  для контрольных образцов

ПЦР с контрольной смесью		
Образец	Значение $C_{tROX}$	Значение $C_{tFAM}$
ОКО	$\leq QC_{ROX}^{1)}$	не определено или $> C_{tПКО}^{2)}+6$
ПКО	Не задано	$\leq QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР) <sup>1)</sup>
ПЦР со смесью BRAF-V600mut		
Образец	Значение $C_{tROX}$	Значение $C_{tFAM}$
ОКО	$\leq QC_{ROX}^{1)}$	не определено или $> C_{tПКО}^{2)}+6$
ПКО	Не задано	$\leq QC_{FAM}$ (аллель-специфичная ПЦР) <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Значения  $QC_{ROX}$  и  $QC_{FAM}$  для контрольной ПЦР и для аллель-специфичной ПЦР указаны на наклейке на упаковке набора реагентов.

<sup>2)</sup>  $C_{tПКО}$  –  $C_t$  ПКО в контрольной ПЦР.

9.1.4 Если величины  $C_t$  контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения  $C_t$  не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 6.

Таблица 6. Другие возможные значения  $C_t$  и возможные проблемы

ПЦР с контрольной смесью			
Образец	Значение $C_{t_{ROX}}$	Значение $C_{t_{FAM}}$	Возможные проблемы
ОКО	$> QC_{ROX}$		Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
		$\leq C_{t_{ПКО}}+6$	Возможна контаминация.
ПКО		$> QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.
ПЦР со смесью BRAF-V600mut			
Образец	Значение $C_{t_{ROX}}$	Значение $C_{t_{FAM}}$	Возможные проблемы
ОКО	$> QC_{ROX}$		Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
		$\leq C_{t_{ПКО}}+6$	Возможна контаминация.
ПКО		$> QC_{FAM}$ (аллель-специфичная ПЦР)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

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

9.1.6 Если значение  $C_{tC}$  определяется в диапазоне  $C_{t_{ПКО}}-4 \leq C_{tC} \leq C_{t_{ПКО}}+4$ , то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутации V600E в гене *BRAF*.

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

9.1.8 Если значение  $C_{tC}$  больше  $C_{t_{ПКО}}+4$ , то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутации V600E в гене *BRAF*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

## 9.2 Анализ результатов аллель-специфичной ПЦР на наличие мутации V600E в гене *BRAF*

9.2.1 Для каждого клинического образца рассчитать разницу  $\Delta C_t = C_{t_{AS}} - C_{tC}$ , где  $C_{t_{AS}}$  –  $C_t$  образца в аллель-специфичной ПЦР,  $C_{tC}$  –  $C_t$  образца в контрольной ПЦР (рисунок 3). Рекомендации по расчёту  $\Delta C_t$  в программе «MS Office Excel» приведены в приложении Б.

9.2.2 Сравнить значения  $\Delta C_t$  клинических образцов ДНК со значением точки отсечения (ТО), которое указано на наклейке на упаковке набора.

9.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V600E в гене *BRAF*), если в обоих повторах значение  $\Delta C_t$  меньше или равно значению ТО.

9.2.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию V600E в гене *BRAF* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если в обоих повторах  $\Delta C_t$  больше ТО, или если в аллель-специфичной ПЦР  $C_t$  образца не определено.

9.2.5 Если в одном из двух повторов образца значение  $\Delta C_t$  меньше или равно ТО, а в другом  $\Delta C_t$  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.

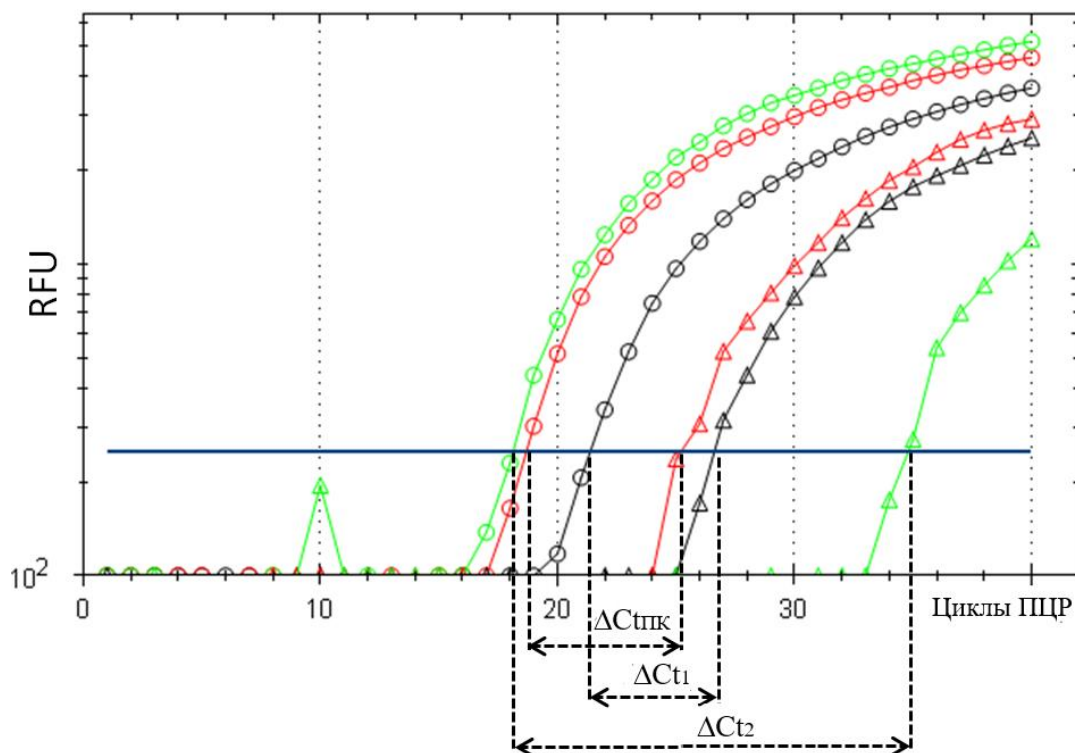


Рисунок 3. Пример кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в логарифмической шкале в контрольной ПЦР (круги) и в аллель-специфичной ПЦР (треугольники) для ПКО (красная линия) и клинических образцов (зеленая и черная линии). Синяя линия – пороговый уровень. Пунктирными линиями показаны величины  $\Delta C_t$  ПКО ( $\Delta C_{tПК}$ ),  $\Delta C_t$  образца №1 с мутацией V600E в гене *BRAF* ( $\Delta C_{t1}$ ) и  $\Delta C_t$  образца №2 без мутации V600E в гене *BRAF* ( $\Delta C_{t2}$ ).

## **10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации**

### **10.1 Условия хранения**

10.1.1 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.

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

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

### **10.2 Условия транспортирования**

10.2.1 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.

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

10.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

10.2.4 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 11).

### **10.3 Условия эксплуатации**

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

10.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

## 11 Гарантийные обязательства

11.1 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.

11.2 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.

11.3 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

11.4 Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по телефону +7 (383) 382-99-07.

## 12 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

## 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 мм<sup>2</sup>. 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 объемом 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».

Открыть файл. В столбце «Target» ввести «Контроль» в ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, ввести «V600mut» в ячейки, соответствующие ПЦР со смесью BRAF-V600mut (рисунок Б1, элемент 1).

Добавить два новых столбца «St<sub>AS</sub>» и «St<sub>C</sub>», St<sub>AS</sub> – St образца в аллель-специфичной ПЦР, St<sub>C</sub> – St образца в контрольной ПЦР (рисунок Б1, элементы 3 и 4).

Значения St в аллель-специфичной ПЦР скопировать в столбце «Cq» и вставить в столбец «St<sub>AS</sub>» (рисунок Б1, элемент 3), значения St в контрольной ПЦР скопировать в столбце «Cq» и вставить в столбец «St<sub>C</sub>» (рисунок Б1, элемент 4), таким образом, чтобы значения St<sub>AS</sub> и St<sub>C</sub> для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец «ΔSt». Используя функцию вычитания, для каждого образца рассчитать разницу  $\Delta St = St_{AS} - St_C$  (рисунок Б1, элемент 5).

Добавить столбец «Т0», внести значение Т0, указанное на наклейке на упаковке набора (рисунок Б1, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔSt клинических образцов ДНК со значением точки отсечения (Т0) и записать результат (рисунок Б1, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V600E в гене *BRAF*), если в обоих повторах значение ΔSt меньше или равно значению Т0.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию V600E в гене *BRAF* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если в обоих повторах ΔSt больше Т0, или если в аллель-специфичной ПЦР St образца не определено.

Если в одном из двух повторов образца значение ΔSt меньше или равно Т0, а в другом ΔSt больше Т0, то результат считают сомнительным и анализ повторяют.

В приведённом примере (рисунок Б1) значение Т0=6.5, образцы ДНК1 и ДНК3 учитываются как содержащие мутацию V600E в гене *BRAF* ( $\Delta St < T_0$ ), образцы ДНК2 и ДНК4 учитываются как не содержащие мутацию V600E в гене *BRAF* ( $\Delta St > T_0$ ).

1 Target	Content	2 Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	3 Ct <sub>AS</sub>	4 Ct <sub>C</sub>	5 ΔCt	6 TO	7 Результат
Контроль	Unkn	ДНК1	21.8	21.8	0,0	23,9	21,8	2,2	6,5	положительный
Контроль	Unkn	ДНК1	21,9	21,9	0,0	23,8	21,9	1,9	6,5	положительный
Контроль	Unkn	ДНК2	21,2	21,2	0,0	32,4	21,2	11,1	6,5	отрицательный
Контроль	Unkn	ДНК2	21,1	21,1	0,0	30,1	21,1	9,0	6,5	отрицательный
Контроль	Unkn	ДНК3	24,8	24,8	0,0	25,9	24,8	1,1	6,5	положительный
Контроль	Unkn	ДНК3	24,9	24,9	0,0	26,4	24,9	1,5	6,5	положительный
Контроль	Unkn	ДНК4	20,7	20,7	0,0	30,7	20,7	10,1	6,5	отрицательный
Контроль	Unkn	ДНК4	20,6	20,6	0,0	31,6	20,6	11,0	6,5	отрицательный
Контроль	NTC	ОКО	nd	0,0	0,0					
Контроль	NTC	ОКО	nd	0,0	0,0					
Контроль	Pos Ctrl	ПКО	20,7	20,7	0,0					
Контроль	Pos Ctrl	ПКО	20,5	20,5	0,0					
V600mut	Unkn	ДНК1	23,9	23,9	0,0					
V600mut	Unkn	ДНК1	23,8	23,8	0,0					
V600mut	Unkn	ДНК2	32,4	32,4	0,0					
V600mut	Unkn	ДНК2	30,1	30,1	0,0					
V600mut	Unkn	ДНК3	25,9	25,9	0,0					
V600mut	Unkn	ДНК3	26,4	26,4	0,0					
V600mut	Unkn	ДНК4	30,7	30,7	0,0					
V600mut	Unkn	ДНК4	31,6	31,6	0,0					
V600mut	NTC	ОКО	nd	0,0	0,0					
V600mut	NTC	ОКО	nd	0,0	0,0					
V600mut	Pos Ctrl	ПКО	26,7	26,7	0,0					
V600mut	Pos Ctrl	ПКО	26,4	27,4	0,0					

Рисунок Б1. Вычисление ΔCt в программе «MS Office Excel»

- 1 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью и со смесью BRAF-V600mut,
  - 2 – в столбце «Sample» обозначены образцы ДНК, ОКО, ПКО,
  - 3 – в столбец «Ct<sub>AS</sub>» скопированы значения Ct образцов в аллель-специфичной ПЦР из столбца «Cq»,
  - 4 – в столбец Ct<sub>C</sub> скопированы значения Ct образцов в контрольной ПЦР из столбца «Cq»,
  - 5 – вычисление разницы ΔCt по формуле  $\Delta Ct = Ct_{AS} - Ct_C$ ,
  - 6 – значение TO (указано на наклейке на упаковке набора реагентов),
  - 7 – результат анализа на наличие мутации V600E в гене *BRAF*.
- 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.  
 na – значение не определено;  
 #ЗНАЧ! – ошибка в значении.

## Библиография

1. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. / H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox et al. // Nature. – 2002. – Vol. 417. – P. 949-954. – DOI: 10.1038/nature00766
2. COSMIC | Catalogue of somatic mutations in cancer [Электронный ресурс]: база данных содержит сведения о соматических мутациях при онкологических заболеваниях человека. – Электрон. дан. – [S. 1.] – Режим доступа: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. – Загл. с экрана.
3. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. / P. B. Chapman, A. Hauschild, C. Robert, et al. // N Engl J Med. – 2011. – Vol. 364. – P. 2507-2516. – DOI: 10.1056/NEJMoa1103782
4. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. / A. Hauschild, J. J. Grob, L. V. Demidov et al. // Lancet. – 2012. – Vol. 380, N 9839. – P. 358-365. – DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X
5. BRAF/MEK inhibition in melanoma patients with rare BRAF mutations. / J. C. Hassel, C. Menzer, A. M. Menzies et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2018. – Vol. 36, N 15\_suppl. – P. 9542-9542. – DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15\_suppl.9542
6. Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. / M. S. Carlino, G. V. Long, R. F. Kefford, H. Rizos. // Crit Rev Oncol Hematol. – 2015. – Vol. 96, N 3. – P. 385-398. – DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.021
7. ESMO Guidelines Committee. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. / O. Michielin, A. C. J. van Akkooi, P. A. Ascierto et al. // Ann Oncol. – 2019. – Vol. 30, N12. – P. 1884-1901. – DOI: 10.1093/annonc/mdz411
8. Cutaneous Melanoma, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. / D. G. Coit, J. A. Thompson, M. R. Albertini et al. // J Natl Compr Canc Netw. – 2019. – Vol. 17, N 4. – P. 367-402. – DOI: 10.6004/jnccn.2019.0018
9. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). / C. R. Newton, A. Graham, L. E. Heptinstall et al. // Nucleic Acids Res. – 1989. – Vol. 17, N 7. – P. 2503-2516. – DOI: 10.1093/nar/17.7.2503
10. Sensitive allele-specific real-time PCR test for mutations in BRAF codon V600 in skin melanoma. / E. Pisareva, N. Gutkina, S. Kovalenko et al. // Melanoma Res. – 2014. – Vol. 24, N 4. – P. 322-331. – DOI: 10.1097/CMR.0000000000000090

**Производитель: ООО «БиоЛинк»**

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

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: [info@biolinklab.ru](mailto:info@biolinklab.ru)

Веб-сайт: [biolinklab.ru](http://biolinklab.ru)