



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БиоЛинк»

Корниенко А.А.

«30» ноября 2021 г.



Набор реагентов для выявления мутаций
в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS*
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме реального времени
"Real-time-PCR-NRAS-3R"
по ТУ 21.20.23-003-57201404-2020

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2022/16413 от 25.01.2022

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	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора.....	7
3.1 Предел обнаружения.....	7
3.2 Аналитическая специфичность, влияние потенциально интерферирующих веществ	7
3.3 Характеристики аналитической эффективности	7
3.4 Диагностическая специфичность	8
3.5 Диагностическая чувствительность	8
3.6 Ограничения при применении	8
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа.....	8
4 Меры предосторожности.....	8
5 Оборудование и материалы.....	10
5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	10
5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов.....	10
6 Анализируемые пробы.....	11
7 Подготовка компонентов для анализа	11
7.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой.....	11
7.2 Подготовка образцов – приготовление разведений.....	12
8 Проведение анализа	13
8.1 Приготовление смеси для контрольной ПЦР.....	13
8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96	14
8.3 Анализ результатов контрольной ПЦР	15
8.4 Приготовление смесей для контрольной ПЦР и для ПЦР на мутации гена <i>NRAS</i>	16
8.5 Программирование и запуск термоциклера CFX96	18
9 Анализ результатов	18
9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР.....	18
9.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена <i>NRAS</i>	20

10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации.....	22
10.1 Условия хранения.....	22
10.2 Условия транспортирования	22
10.3 Условия эксплуатации	22
11 Гарантийные обязательства	23
12 Маркировка	23
Библиография.....	24
Приложение А (справочное) Список мутаций 12-го, 13-го и 61-го кодона гена <i>NRAS</i> согласно базе данных COSMIC.....	25
Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков	26
Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel».....	27

Введение

Ген *NRAS* кодирует внутриклеточный белок – компонент сигнальных каскадов RAS-МАРК и RAS-МЕК-ERK, контролирующих пролиферацию и дифференциацию клеток в ответ на внешние митогенные стимулы [1].

Активирующие соматические мутации гена *NRAS* приводят к постоянной гиперактивации внутриклеточных сигнальных путей. Мутации в гене *NRAS* выявляются при меланоме кожи (~23%), при раке щитовидной железы (~12%), остром лимфобластном лейкозе (~14%), острой миелоидной лейкемии (~10%), раке прямой кишки (~5%), раке лёгкого (~1%). Наиболее часто встречаются мутации 61-го кодона гена *NRAS*, более редко – мутации 12-го и 13-го кодонов этого гена. Совокупно мутации в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* составляют 90,3% всех мутаций или 98,8% клинически значимых мутаций этого гена [2].

Наличие мутаций в гене *NRAS* ассоциировано с резистентностью к терапии анти-EGFR антителами (цетуксимаб и панитумумаб) у пациентов с метастатическим раком прямой кишки [3]. Таким пациентам рекомендовано выполнять анализ на мутации гена *NRAS* для определения дальнейшей тактики лечения. Пациентам, имеющим мутации в гене *NRAS*, противопоказано назначение моноклональных анти-EGFR антител [4, 5, 6].

Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-NRAS-3R" по ТУ 21.20.23-003-57201404-2020» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-NRAS-3R (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-NRAS-3R (36)".

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах (G12X, G13X и Q61X) гена *NRAS* методом ПЦР в режиме реального времени с подавлением амплификации ДНК дикого типа. Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани. Результаты анализа на мутации гена *NRAS* влияют на выбор таргетного препарата в лечении метастатического рака прямой кишки. Пациентам с мутацией в гене *NRAS* не рекомендовано назначение

моноклональных анти-EGFR антител (цетуксимаб и панитумумаб). Для проведения ПЦР используется «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями» исполнения: «С1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США). 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	Зелёный	Контрольная ПЦР-смесь	740 мкл	2*1100 мкл
2	Жёлтый	ПЦР-смесь G12/13X	280 мкл	840 мкл
3	Жёлтый	ПЦР-смесь Q61X	280 мкл	840 мкл
4	Синий	Тaq ДНК-полимераза	25 мкл	55 мкл
5	Красный	ПКО ¹	90 мкл	270 мкл
6	Белый	ОКО ²	1400 мкл	4000 мкл
7	Бесцветный	10x UDG буфер	36 мкл	110 мкл
8	Бесцветный	UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	9 мкл	27 мкл

1) ПКО – положительный контрольный образец, содержащий 5% ДНК рекомбинантных плазмид с фрагментами гена *NRAS* с мутациями Q61R, G12D на фоне ДНК человека с геном *NRAS* без мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах;

2) ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий 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-NRAS-3R (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-NRAS-3R (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 повторах) или 14 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в двух повторах).

2.3 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе ПЦР в режиме реального времени с подавлением амплификации ДНК дикого типа.

Набор содержит 3 смеси для ПЦР: контрольная ПЦР-смесь, ПЦР-смесь G12/13X для выявления мутаций 12-го и 13-го кодонов гена *NRAS* и ПЦР-смесь Q61X для выявления мутаций 61-го кодона гена *NRAS*.

В контрольной ПЦР происходит амплификация участка 3-го экзона гена *NRAS*. Продукты ПЦР гена *NRAS* 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'-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 G12/13X и Q61X содержат реагенты для амплификации участков 2-го и 3-го экзонов гена *NRAS* в присутствии олигонуклеотидов-блокеров, подавляющих амплификацию ДНК с кодонами дикого типа в положениях 12, 13 или 61 относительно белка *NRAS*. 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 5% ДНК рекомбинантных плазмид с фрагментами гена *NRAS* с мутациями Q61R, G12D на фоне ДНК рекомбинантной плазмиды с фрагментом гена *NRAS* без мутаций. 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 *NRAS* состоит из двух этапов:

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

На первом этапе проводят ПЦР с контрольной смесью для оценки пригодности и выбора подходящего разведения образцов ДНК. 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 ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину C_t относительно C_t ПКО.

На втором этапе ДНК с выбранными разведениями анализируют одновременно ещё раз в контрольной ПЦР и в ПЦР с подавлением амплификации гена *NRAS* дикого типа. В ПЦР со смесью G12/13X происходит амплификация участка 2-го экзона гена *NRAS*, в ПЦР со смесью Q61X происходит амплификация участка 3-го экзона гена *NRAS*. ПЦР-смеси G12/13X и Q61X содержат олигонуклеотиды-блокеры, которые имеют последовательность ДНК дикого типа для 12-го, 13-го и 61-го кодонов гена *NRAS* и модифицированные нуклеотиды, повышающие температуру плавления. Олигонуклеотиды-блокеры прочно связываются с ДНК гена *NRAS* дикого типа и подавляют её амплификацию. Если в любом из этих участков есть мутация, то блокеры связываются не прочно, в результате амплификация подавляется незначительно или совсем не подавляется. Список возможных мутаций 12-го, 13-го и 61-го кодона гена *NRAS* согласно базе данных COSMIC приведён в приложении А.

Наличие мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена *NRAS* определяется по разнице между значениями C_t в ПЦР со смесью G12/13X и в контрольной ПЦР. Наличие мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* определяется по разнице между значениями C_t в ПЦР со смесью Q61X и в контрольной ПЦР.

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией в 61-м кодоне гена *NRAS* на фоне ДНК гена *NRAS* без мутаций, 5% ДНК с мутацией в 12-м или 13-м кодоне гена *NRAS* на фоне ДНК гена *NRAS* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 40 мкл с концентрацией 1,8 нг/мкл (600 копий гена *NRAS* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние потенциально интерферирующих веществ

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *NRAS* без мутаций.

Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилитол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS*.

Содержание парафина без ткани на срезе от 59% до 79% не влияет на результаты определения мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS*. Содержание некротической ткани на срезе от 5% до 50% не влияет на результаты определения мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS*.

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. Значение повторяемости результатов при определении мутаций в 12-м и 13-м кодоне гена *NRAS* составило 100%, при определении мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* 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. Значение воспроизводимости результатов при определении мутаций в 12-м и 13-м кодоне гена *NRAS* составило 100%, при определении мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* составило 100% (интервал 97,97-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* в клинических испытаниях на выборке из 58 образцов составила 100% (интервал 89,57-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* в клинических испытаниях на выборке из 58 образцов составила 100% (интервал 86,68-100% 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 по площади. Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *NRAS* оценивается по значению C_t 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.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

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

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 клинико-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.
- 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 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.
- 4.14 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».
- 4.15 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.
- 4.16 Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

5 Оборудование и материалы

5.1 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: «C1000 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 XM-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.

5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

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

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

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключённых 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 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.

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 выделения ДНК из срезов FFPE тканей используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов, рекомендуемый набор: «Экстракт ДНК 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 Б.

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 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.

7.1.1 Разморозить ОКО (пробирка №6, белая крышка), 10x UDG буфер (пробирка №7, бесцветная крышка) и образцы ДНК, перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 3 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

7.1.2 Приготовить UDG-смесь: добавить в пробирку объёмом 1,5 мл ОКО, 10х UDG буфер и UDG (пробирка №8, бесцветная крышка) и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Количество реагентов на один образец ДНК приведено в таблице 2, для тестирования N клинических образцов ДНК указанное количество необходимо умножить на (N+1).

Таблица 2. Состав UDG-смеси

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

7.1.3 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.

7.1.4 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.

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 Б) для большинства образцов достаточно разведение в 5-20 раз, поэтому сначала рекомендуется тестировать все образцы в разведениях 1/5 и 1/20.

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

7.2.2 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

7.2.3 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.

8 Проведение анализа

8.1 Приготовление смеси для контрольной ПЦР

8.1.1 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

8.1.2 Контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПКО (пробирка №5, красная крышка) и ОКО (пробирка №6, 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.

8.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 8.1.1): внести в пробирку расчётное количество контрольной ПЦР-смеси, добавить Taq ДНК-полимеразу (пробирка №4, 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 или плашки для ПЦР на 96 лунок.

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

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).

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 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.

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 флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации 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 5.

Таблица 5. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	55°C	40 сек	
30	Денатурация	95°C	15 сек	Да
	Отжиг праймеров, элонгация	55°C	40 сек	

8.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

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

8.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

8.2.5 Запустить протокол ПЦР.

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 6, раздел таблицы «ПЦР с контрольной смесью»). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *NRAS* 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 упаковке набора и в паспорте).

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 мутаций гена *NRAS*.

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 мутаций гена *NRAS*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

8.4 Приготовление смесей для контрольной ПЦР и для ПЦР на мутации гена *NRAS*

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 4, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на $(2N + 5)$.

8.4.2 Разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПЦР-смесь G12/13X (пробирка №2, жёлтая крышка), ПЦР-смесь Q61X (пробирка №3, жёлтая крышка), ПКО (пробирка №5, красная крышка) и ОКО (пробирка №6, белая крышка), убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.4.3 Промаркировать три чистые пробирки объёмом 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 контрольную ПЦР-смесь, в пробирку №2 – ПЦР-смесь G12/13X, в пробирку №3 – ПЦР-смесь Q61X. Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК-полимеразу (пробирка №4, синяя крышка). Перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс) и центрифугировать в течение 5 секунд, 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 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
	К	К	К	К	К	К	К	К
G12/13X	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	Г	Г	Г	Г	Г	Г	Г	Г
Q61X	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q

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

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

К – контрольная смесь, G – ПЦР-смесь G12/13X, Q – ПЦР-смесь Q61X.

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

8.4.6 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 воды;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

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

8.4.7 Перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

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

8.4.9 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 5.

9 Анализ результатов

9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

9.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. 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 мутаций гена *NRAS* только в том случае, если величины C_t для ОКО, 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 $Q_{C_{ROX}}$;

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

– для ПКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $C_{t_{ПКО}}$ меньше или равно $Q_{C_{FAM}}$ (контрольная ПЦР), в ПЦР со смесями G12/13X и Q61X наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $C_{t_{ПКО}}$ меньше или равно $Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР G12/13X и Q61X)

Значения $Q_{C_{ROX}}$ и $Q_{C_{FAM}}$ для контрольной ПЦР и для ПЦР со смесями G12/13X и Q61X указаны на наклейке на упаковке набора.

Таблица 6. Допустимые значения St для контрольных образцов

ПЦР с контрольной смесью		
Образец	Значение St_{ROX}	Значение St_{FAM}
ОКО	$\leq QC_{ROX}^1$	не определено или $> St_{ПКО}^2+6$
ПКО	Не задано	$\leq QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР) ¹
ПЦР со смесями G12/13X и Q61X		
Образец	Значение St_{ROX}	Значение St_{FAM}
ОКО	Не задано	не определено или $> St_{ПКО}^2+6$
ПКО	Не задано	$\leq QC_{FAM}$ (ПЦР G12/13X и Q61X) ¹

1) Значения QC_{ROX} и QC_{FAM} для контрольной ПЦР и для ПЦР со смесями G12/13X и Q61X указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте.

2) $St_{ПКО}$ – St ПКО в этой же постановке ПЦР.

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

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

ПЦР с контрольной смесью			
Образец	Значение St_{ROX}	Значение St_{FAM}	Возможные проблемы
ОКО	$> QC_{ROX}$		Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
		$\leq St_{ПКО}+6$	Возможна контаминация.
ПКО		$> QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.
ПЦР со смесями G12/13X и Q61X			
Образец	Значение St_{ROX}	Значение St_{FAM}	Возможные проблемы
ОКО		$\leq St_{ПКО}+6$	Возможна контаминация.
ПКО		$> QC_{FAM}$ (ПЦР G12/13X и Q61X)	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 $C_{tПКО}-4 \leq C_{tC} \leq C_{tПКО}+4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *NRAS*.

9.1.7 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.

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

9.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена *NRAS*

9.2.1 Для каждого клинического образца рассчитать значения

$\Delta C_{tG12/13X} = C_{tG12/13X} - C_{tC}$ и $\Delta C_{tQ61X} = C_{tQ61X} - C_{tC}$, где C_{tC} – C_t образца в контрольной ПЦР, $C_{tG12/13X}$ – C_t образца в ПЦР со смесью G12/13X, C_{tQ61X} – C_t образца в ПЦР со смесью Q61X. Рекомендации по расчёту ΔC_t в программе «MS Office Excel» приведены в приложении В.

9.2.2 Сравнить значение $\Delta C_{tG12/13X}$ образцов ДНК со значением первой точки отсечения ($TO_{G12/13X}$), сравнить значение ΔC_{tQ61X} образцов ДНК со значением второй точки отсечения (TO_{Q61X}). Значения $TO_{G12/13X}$ и TO_{Q61X} указаны на упаковке набора.

9.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в 12-м или 13-м кодонах гена *NRAS*), если для обеих дублей значения $\Delta C_{tG12/13X}$ меньше или равны значению $TO_{G12/13X}$. Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в 61-м кодоне гена *NRAS*), если для обеих дублей значения ΔC_{tQ61X} меньше или равны значению TO_{Q61X} .

9.2.4 Образец учитывается как отрицательный (без мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обеих дублей значения $\Delta C_{tG12/13X}$ больше $TO_{G12/13X}$, или в ПЦР со смесью G12/13X значение $C_{tG12/13X}$ не определено. Образец учитывается как отрицательный (без мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обеих дублей значения ΔC_{tQ61X} больше TO_{Q61X} , или в ПЦР со смесью Q61X значение C_{tQ61X} не определено.

9.2.5 Если для одного из дублей значение $\Delta Ct_{G12/13X}$ меньше или равно $TO_{G12/13X}$ (или ΔCt_{Q61X} меньше или равно TO_{Q61X}), а для другого дубля $\Delta Ct_{G12/13X}$ больше $TO_{G12/13X}$ (или ΔCt_{Q61X} больше TO_{Q61X}), 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.

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

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

Библиография

1. Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology / C. Muñoz-Maldonado, Y. Zimmer, M. Medová // Front Oncol. – 2019. – Vol 9:1088. – P. 1-22. – DOI: 10.3389/fonc.2019.01088
2. My Cancer Genome | Genetically Informed Cancer Medicine [Электронный ресурс]: клиническое значение молекулярных маркёров – Электрон. дан. – [S. 1.] – Режим доступа: <https://www.mycancergenome.org/content/gene/nras/> – Загл. с экрана.
3. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. / J. Y. Douillard, K. S. Oliner, S. Siena, et al. // N Engl J Med. – 2013 – Vol. 369 (11). – P. 1023-34. – DOI: 10.1056/NEJMoa1305275
4. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015 / C. J. Allegra, R. B. Rumble, S. R. Hamilton, et al. // J Clin Oncol. – 2016. – Vol. 34, N 2. – P. 179-85. – DOI: 10.1200/JCO.2015.63.9674
5. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. / E. Van Cutsem, A. Cervantes, B. Nordlinger, D. Arnold, ESMO Guidelines Working Group // Ann Oncol. – 2014. – Vol. 25. – Suppl. 3. – P. iii1-9. – DOI: 10.1093/annonc/mdu260
6. Клинические рекомендации Рак прямой кишки / Министерство Здравоохранения РФ // Год утверждения (частота пересмотра): 2020. – ID: КР554/1. – 100 с.

Приложение А (справочное) Список мутаций 12-го, 13-го и 61-го кодона гена *NRAS* согласно базе данных COSMIC

Экзон	Кодон	Мутация (замена нуклеотида)	Мутация (замена аминокислоты)	ID мутации в COSMIC
2	12	c.35G>A	p.G12D	564
		c.34G>A	p.G12S	563
		c.34G>T	p.G12C	562
		c.35G>T	p.G12V	566
		c.35G>C	p.G12A	565
		c.34G>C	p.G12R	561
		c.34_35GG>AA	p.G12N	12723
		c.36T>C	p.G12G	567
		c.34_35GG>CC	p.G12P	559
		c.34_35GG>TA	p.G12Y	560
	13	c.38G>A	p.G13D	573
		c.37G>C	p.G13R	569
		c.38G>T	p.G13V	574
		c.37G>T	p.G13C	570
		c.38G>C	p.G13A	575
		c.37G>A	p.G13S	571
		c.39T>C	p.G13G	576
		c.37_38GG>AA	p.G13N	24668
		c.37_38GG>TA	p.G13Y	568
		c.38_39GT>TC	p.G13V	572
3	61	c.182A>G	p.Q61R	584
		c.181C>A	p.Q61K	580
		c.182A>T	p.Q61L	583
		c.183A>T	p.Q61H	585
		c.183A>C	p.Q61H	586
		c.182A>C	p.Q61P	582
		c.181C>G	p.Q61E	581
		c.183A>G	p.Q61Q	587
		c.181_182CA>AG	p.Q61R	579
		c.181_182CA>TT	p.Q61L	12725
		c.182_183AA>TG	p.Q61L	30646
		c.182_183AA>GG	p.Q61R	33693
		c.181_183CAA>AAG	p.Q61K	53223
		c.183_184AG>CA	p.Q61_E62>HK	26494

Приложение Б (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 объемом 1,5 мл и выделить ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК из FFPE ткани, зарегистрированного в РФ.

Приложение В (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 следующие обозначения: «контроль» в ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, «G12/13X» в ячейки, соответствующие ПЦР со смесью G12/13X, «Q61R» в ячейки, соответствующие ПЦР со смесью Q61R (рисунок В1, элемент 1).

Добавить новый столбец «Ct_C», где Ct_C – Ct образца в контрольной ПЦР (рисунок В1, элемент 4). Значения Ct в контрольной ПЦР скопировать в столбце «Cq» и вставить в столбец «Ct_C» (рисунок В1, 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 рассчитать разницу $\Delta Ct = Cq - Ct_C$ (рисунок В1, элемент 5), что соответствует $\Delta Ct_{G12/13X} = Ct_{G12/13X} - Ct_C$ и $\Delta Ct_{Q61X} = Ct_{Q61X} - Ct_C$, где Ct_{G12/13X} – Ct образца в ПЦР со смесью G12/13X, Ct_{Q61X} – Ct образца в ПЦР со смесью Q61X.

Добавить столбец «TO», внести значения TO_{G12/13X} и TO_{Q61X}, указанные на наклейке на упаковке набора (рисунок В1, элемент 6).

Добавить столбец «результат» (рисунок В1, элемент 7).

Сравнить значение $\Delta Ct_{G12/13X}$ образцов ДНК со значением первой точки отсечения (TO_{G12/13X}), сравнить значение ΔCt_{Q61X} образцов ДНК со значением второй точки отсечения (TO_{Q61X}).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в 12-м или 13-м кодонах гена *NRAS*), если для обеих дублей значение $\Delta Ct_{G12/13X}$ меньше или равно значению TO_{G12/13X}. Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в 61-м кодоне гена *NRAS* в гене *NRAS*), если для обеих дублей значение ΔCt_{Q61X} меньше или равно значению TO_{Q61X}.

Образец учитывается как отрицательный (без мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обеих дублей $\Delta Ct_{G12/13X}$ больше TO_{G12/13X}, или если в ПЦР со смесью G12/13X значение Ct_{G12/13X} не определено. Образец учитывается как отрицательный (без мутаций в 61-м кодоне гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обеих дублей ΔCt_{Q61X} больше TO_{Q61X}, или если в ПЦР со смесью Q61X значение Ct_{Q61X} не определено.

1	2	3	4	5	6	7			
Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	StC	ΔCt	TO	Результат
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0.0	0.0				
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0.0	0.0				
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	17.3	17.3	0.0				
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	17.3	17.3	0.0				
контроль	Unkn-01	ДНК1	20.1	20.4	0.5				
контроль	Unkn-01	ДНК1	20.8	20.4	0.5				
контроль	Unkn-04	ДНК2	19.1	19.4	0.5				
контроль	Unkn-04	ДНК2	19.8	19.4	0.5				
контроль	Unkn-13	ДНК3	16.4	16.4	0.0				
контроль	Unkn-13	ДНК3	16.5	16.4	0.0				
контроль	Unkn-15	ДНК4	15.2	15.6	0.6				
контроль	Unkn-15	ДНК4	16.0	15.6	0.6				
контроль	Unkn-16	ДНК5	16.5	16.7	0.3				
контроль	Unkn-16	ДНК5	16.9	16.7	0.3				
G12/13X	NTC-02	ОКО	nd	0.0	0.0				
G12/13X	NTC-02	ОКО	nd	0.0	0.0				
G12/13X	Pos Ctrl-02	ПКО	22.3	22.2	0.2				
G12/13X	Pos Ctrl-02	ПКО	22.1	22.2	0.2				
G12/13X	Unkn-05	ДНК1	nd	0.0	0.0	20.1	#ЗНАЧ!	7.0	отрицательный
G12/13X	Unkn-05	ДНК1	nd	0.0	0.0	20.8	#ЗНАЧ!	7.0	отрицательный
G12/13X	Unkn-08	ДНК2	nd	0.0	0.0	19.1	#ЗНАЧ!	7.0	отрицательный
G12/13X	Unkn-08	ДНК2	39.1	39.1	0.0	19.8	19.3	7.0	отрицательный
G12/13X	Unkn-17	ДНК3	27.3	27.7	0.6	16.4	10.9	7.0	отрицательный
G12/13X	Unkn-17	ДНК3	28.1	27.7	0.6	16.5	11.6	7.0	отрицательный
G12/13X	Unkn-19	ДНК4	26.9	26.7	0.4	15.2	11.7	7.0	отрицательный
G12/13X	Unkn-19	ДНК4	26.4	26.7	0.4	16.0	10.4	7.0	отрицательный
G12/13X	Unkn-20	ДНК5	17.5	17.4	0.0	16.5	0.9	7.0	положительный
G12/13X	Unkn-20	ДНК5	17.4	17.4	0.0	16.9	0.5	7.0	положительный
Q61R	NTC-03	ОКО	nd	0.0	0.0				
Q61R	NTC-03	ОКО	nd	0.0	0.0				
Q61R	Pos Ctrl-03	ПКО	21.1	21.0	0.1				
Q61R	Pos Ctrl-03	ПКО	21.0	21.0	0.1				
Q61R	Unkn-09	ДНК1	nd	0.0	0.0	20.1	#ЗНАЧ!	6.0	отрицательный
Q61R	Unkn-09	ДНК1	nd	0.0	0.0	20.8	#ЗНАЧ!	6.0	отрицательный
Q61R	Unkn-12	ДНК2	23.7	23.9	0.3	19.1	4.6	6.0	положительный
Q61R	Unkn-12	ДНК2	24.0	23.9	0.3	19.8	4.3	6.0	положительный
Q61R	Unkn-21	ДНК3	25.2	25.6	0.5	16.4	8.8	6.0	отрицательный
Q61R	Unkn-21	ДНК3	26.0	25.6	0.5	16.5	9.5	6.0	отрицательный
Q61R	Unkn-23	ДНК4	15.8	15.9	0.0	15.2	0.6	6.0	положительный
Q61R	Unkn-23	ДНК4	15.9	15.9	0.0	16.0	-0.1	6.0	положительный
Q61R	Unkn-24	ДНК5	25.4	25.3	0.1	16.5	8.8	6.0	отрицательный
Q61R	Unkn-24	ДНК5	25.2	25.3	0.1	16.9	8.3	6.0	отрицательный

Рисунок В1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

- 1 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, со смесью G12/13X, со смесью Q61R.
- 2 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО, ПКО.
- 3 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct образцов в контрольной ПЦР.
- 4 – столбец StC, в который вставлены значения Ct из столбца «Cq».
- 5 – вычисление значений $\Delta Ct_{G12/13X}$ и ΔCt_{Q61X} по формуле $\Delta Ct = Cq - StC$
- 6 – значения $TO_{G12/13X}$ и TO_{Q61X} (указаны на наклейке на упаковке набора реагентов).
- 7 – результат анализа на наличие мутации.

В приведённом примере (рисунок В1) значение $TO_{G12/13X} = 7.0$, $TO_{Q61X} = 6.0$.

Образцы ДНК1 и ДНК3 учитываются как отрицательные, то есть, не содержат мутации в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена *NRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения, поскольку

– для образца ДНК1 в ПЦР со смесью G12/13X значение $Ct_{G12/13X}$ не определено, в ПЦР со смесью Q61X значение Ct_{Q61X} не определено,

– для образца ДНК3 для обоих дублей $\Delta Ct_{G12/13X} > TO_{G12/13X}$ и $\Delta Ct_{Q61X} > TO_{Q61X}$.

Образец ДНК5 учитывается как положительный, содержащий мутацию в 12-м или 13-м кодонах гена *NRAS*, так как для этого образца для обоих дублей $\Delta Ct_{G12/13X} < TO_{G12/13X}$.

Образцы ДНК2 и ДНК4 учитываются как положительные, содержащие мутацию в 61-м кодоне гена *NRAS*, поскольку для обоих дублей значения $\Delta Ct_{Q61X} < TO_{Q61X}$.

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