



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

 Корниенко А.А.

22 декабря 2025 г.



Набор реагентов для выявления метилирования  
в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2*  
методом ПЦР в реальном времени  
**"Real-time-PCR-SEPT9-SDC2-Met"**  
по ТУ 20.59.52-015-57201404-2024

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



## Содержание

Введение .....	3
1 Назначение набора .....	3
2 Характеристика набора.....	4
2.1 Варианты исполнения .....	4
2.2 Комплектность .....	4
2.3 Состав набора реагентов.....	4
2.4 Число анализируемых проб .....	6
2.5 Принцип действия набора .....	6
3 Аналитические и диагностические характеристики набора.....	8
3.1 Предел обнаружения.....	8
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ.....	8
3.3 Характеристики аналитической эффективности .....	8
3.4 Диагностическая специфичность .....	9
3.5 Диагностическая чувствительность .....	9
3.6 Ограничения при применении.....	9
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа.....	9
4 Риски, связанные с применением набора реагентов .....	10
5 Меры предосторожности.....	11
6 Оборудование и материалы .....	12
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов.....	12
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов .....	13
7 Анализируемые пробы.....	14
8 Протокол выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови и проведения бисульфитной конверсии ДНК.....	14
8.1 Подготовка реагентов .....	14
8.2 Выделение ДНК из плазмы крови.....	15
8.3 Бисульфитная конверсия ДНК .....	16
9 Протокол выявления метилирования ДНК в области промоторов генов <i>SEPT9</i> и <i>SDC2</i> методом ПЦР в реальном времени .....	17
9.1 Подготовка реагентов .....	17
9.2 Приготовление смеси для ПЦР .....	18
9.3 Программирование и запуск термоциклера.....	19

10	Анализ результатов .....	20
10.1	Критерии достоверности результатов ПЦР .....	20
10.2	Анализ результатов ПЦР в реальном времени на наличие метилирования ДНК в областях промоторов генов <i>SEPT9</i> и <i>SDC2</i> .....	21
11	Условия хранения, транспортирования и эксплуатации .....	22
11.1	Условия хранения .....	22
11.2	Условия транспортирования .....	22
11.3	Условия эксплуатации .....	23
11.4	Условия утилизации .....	23
12	Гарантийные обязательства .....	23
12.1	Гарантии производителя .....	23
12.2	Рекламации .....	23
13	Маркировка .....	24
	Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по приготовлению плазмы крови ..	25
	Библиография .....	26

## Введение

Ген *SEPT9* кодирует ГТФ-связывающий белок, формирующий филаменты, задействованные в цитокинезе, поддержании структуры мембран и организации внутриклеточного пространства [1]. Ген *SDC2* кодирует трансмембранный белок синдекан-2, задействованный в регуляции клеточной пролиферации, миграции и межклеточных взаимодействий [2]. Нарушения регуляции генов *SEPT9* и *SDC2* обнаружены при различных онкологических заболеваниях [3-5]. Аберрантное метилирование ДНК в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* ассоциировано с развитием колоректального рака [6-8]. Выявление метилированных фрагментов ДНК во внеклеточной ДНК плазмы крови может быть использовано для ранней диагностики колоректального рака и предраковых состояний (аденоматозных полипов) [9].

## 1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови, бисульфитной конверсии ДНК и выявления метилирования ДНК в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* методом ПЦР в реальном времени (качественный анализ). Биологическим материалом для проведения анализа является плазма крови.

Функциональное назначение: вспомогательное средство при скрининге на колоректальный рак для людей, которые не могут или не хотят проходить такие общепринятые скрининговые тесты, как колоноскопия или анализ кала на скрытую кровь. Положительный результат анализа позволяет выявить пациентов из группы риска (с подозрением на колоректальный рак). Для подтверждения диагноза всем пациентам с подозрением на колоректальный рак рекомендуется выполнение колоноскопии со взятием биопсийного материала в случае выявления новообразований.

Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: анализ рекомендовано проходить ежегодно здоровым и бессимптомным людям в возрасте 50 лет и старше. Ложноположительные результаты анализа могут быть получены у людей с хроническим гастритом, с раком лёгкого, с доброкачественными новообразованиями слизистой оболочки кишечника (тубулярная аденома, зубчатая дисплазия, полипы), а также у беременных женщин.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

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

## 2 Характеристика набора

### 2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления метилирования в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* методом ПЦР в реальном времени "Real-time-PCR-SEPT9-SDC2-Met" по ТУ 20.59.52-015-57201404-2024» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 8 образцов "Real-time-PCR-SEPT9-SDC2-Met (8)";
- 2) Набор реагентов на 48 образцов "Real-time-PCR-SEPT9-SDC2-Met (48)".

### 2.2 Комплектность

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт качества. Набор реагентов содержит пробирки и флаконы с реагентами для выделения ДНК и проведения бисульфитной конверсии в коробке 1 (таблица 1), пробирки с реагентами для проведения ПЦР в реальном времени и флаконы с контрольными образцами в коробке 2 (таблица 2).

### 2.3 Состав набора реагентов

Таблица 1. Компоненты набора для выделения ДНК и бисульфитной конверсии

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объем / масса	
			на 8 образцов	на 48 образцов
1	красная	Магнитные частицы MNA	80 мкл	480 мкл
2	бесцветная	Лизирующий буфер LB	8 мл	48 мл
3	бесцветная	Промывочный буфер WB1	4 мл	24 мл
4	бесцветная	Промывочный буфер WB2	16 мл	2*60 мл
5	белая	Буфер DS	1365 мкл	6*1365 мкл
6	розовая	Буфер К (в сухом виде)	537.5 мг	6*537.5 мг
7	бирюзовая	Буфер NH	500 мкл	600 мкл
8	синяя	Буфер H1 (в сухом виде)	40 мг	6*40 мг
9	голубая	Буфер H2	720 мкл	6*720 мкл
10	бесцветная	Буфер Т	2*2,7 мл	32 мл
11	бесцветная	Буфер для разведения	3 мл	15 мл
12	зелёная	Элюирующий буфер EB	340 мкл	2*1400 мкл

Магнитные частицы MNA – магнитные частицы для сорбции ДНК.

Лизирующий буфер LB – буферный раствор и детергент для лизиса белков и эффективного выделения ДНК.

Промывочный буфер WB1 – буферный раствор и детергент для отмывки ДНК на магнитных частицах.

Промывочный буфер WB2 – раствор для отмывки ДНК на магнитных частицах.

Буфер DS – раствор для промежуточной элюции ДНК.

Буфер K – соль (бисульфит натрия) для конверсии ДНК в сухом виде.

Буфер NH – щелочь для приготовления компонентов набора (буферов DS и K).

Буфер H1 – реагент для проведения бисульфитной конверсии ДНК в сухом виде.

Буфер H2 – буфер для растворения реагента для бисульфитной конверсии.

Буфер T – буферный раствор для стабилизации pH растворов.

Буфер для разведения – буферный раствор для разведения реагентов.

Элюирующий буфер EB – буферный раствор для элюции ДНК с магнитных частиц.

Таблица 2. Компоненты набора для проведения ПЦР в реальном времени и контрольные образцы

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём	
			на 8 образцов	на 48 образцов
13	красная	ПКО	5 мл	6*5 мл
14	бирюзовая	ОКО	5 мл	6*5 мл
15	жёлтая	ПЦР-смесь SEPT9-SDC2	370 мкл	2*1100 мкл
16	синяя	Тaq ДНК-полимераза	40 мкл	240 мкл

ПКО – положительный контрольный образец, который содержит смесь фрагментов ДНК, соответствующих метилированным и неметилированным областям промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* в растворе, имитирующем плазму крови человека.

ОКО – отрицательный контрольный образец, который содержит фрагмент ДНК, соответствующий неметилированным областям промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* в растворе, имитирующем плазму крови человека.

ПЦР-смесь SEPT9-SDC2 – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации участков генов *SEPT9* и *SDC2*.

Тaq ДНК-полимераза – высокоочищенный рекомбинантный фермент Тaq ДНК-полимераза.

Набор реагентов не содержит биологических материалов животного и человеческого происхождения (за исключением фрагментов ДНК человека). Компоненты набора в рабочих концентрациях не являются канцерогенными,

мутагенными или токсичными, не приводят к сенсibilизации, аллергической реакции, не влияют отрицательно на репродуктивную функцию.

## 2.4 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 48 образцов "Real-time-PCR-SEPT9-SDC2-Met (48)" содержит реактивы для выделения ДНК, проведения бисульфитной конверсии и постановки ПЦР для анализа 48 образцов, включая контрольные образцы. Указанное количество реагентов позволяет проанализировать 44 клинических образца и 4 контрольных образца в двух постановках ПЦР (по 22 клинических образца с ПКО и ОКО) или 36 клинических образцов и 12 контрольных образцов в шести постановках ПЦР (по 6 клинических образцов с ПКО и ОКО в каждой постановке).

Набор реагентов на 8 образцов "Real-time-PCR-SEPT9-SDC2-Met (8)" содержит реактивы для выделения ДНК, проведения бисульфитной конверсии и постановки ПЦР для анализа 8 образцов, включая контрольные образцы. Указанное количество реагентов позволяет проанализировать 6 клинических образцов с контрольными образцами ПКО и ОКО в одной постановке.

## 2.5 Принцип действия набора

Набор предназначен для выявления метилирования ДНК в областях промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* в образцах внеклеточной ДНК плазмы крови. Процедура состоит из двух этапов.

На первом этапе проводится выделение ДНК из плазмы крови и процедура бисульфитной конверсии ДНК. Для выделения ДНК используют сорбент на основе магнитных частиц и буферные растворы, обеспечивающие связывание нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц. После сорбции ДНК магнитные частицы собирают на дне пробирки с помощью магнитного штатива и промывают промывочным буфером. При промывке ДНК остаётся связанной с магнитными частицами, а белки плазмы удаляются. Затем проводят бисульфитную конверсию ДНК. Обработка специальными растворами позволяет преобразовать неметилированный цитозин в урацил, в то время как метилированные цитозины защищены от такого преобразования [10]. Оценка представленности неконвертированного цитозина позволяет сделать вывод об уровне метилирования ДНК в конкретном участке ДНК [11]. После проведения бисульфитной конверсии и промывки магнитных частиц образцы конвертированной ДНК (бис-ДНК) элюируют в раствор с помощью элюирующего буфера.

В ходе второго этапа методом ПЦР в реальном времени с использованием специфических флуоресцентных зондов оценивается представленность

неконвертированных цитозинон в промоторных участках генов *SEPT9* и *SDC2*. Реакционные смеси содержат специфические праймеры для амплификации контрольного локуса в области гена актина и исследуемых областей генов *SEPT9* и *SDC2*. Детекция продуктов ПЦР осуществляется в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan-зондов, меченных флуорофорами. Для детекции продукта ПЦР контрольного локуса используют TaqMan-зонд, меченный флуорофором VIC. Флуорофор VIC детектируют по каналу HEX, поскольку флуорофоры VIC и HEX сходны по спектральным характеристикам. Для детекции продуктов ПЦР промоторных областей генов *SEPT9* и *SDC2* используют TaqMan зонды, меченные флуорофорами FAM (для *SEPT9*) и ROX (для *SDC2*). ПЦР-смеси содержат все необходимые компоненты за исключением Taq ДНК-полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

В состав набора входят положительный (ПКО) и отрицательный (ОКО) контрольные образцы, которые необходимы для оценки корректности прохождения всех стадий анализа. При проведении исследования на первом этапе проводят выделение и бисульфитную конверсию контрольных образцов ПКО и ОКО одновременно с клиническими образцами. Полученные образцы ДНК клинических и контрольных образцов после бисульфитной конверсии (бис-ДНК) используют для проведения ПЦР в реальном времени. В каждой постановке ПЦР кроме клинических образцов необходимо анализировать бис-ДНК ПКО и бис-ДНК ОКО. Каждый из клинических и контрольных образцов тестируют в ПЦР в трёх повторах.

Анализ результатов ПЦР:

1. Для оценки достоверности результатов ПЦР проверяют значения  $C_q$  для контрольных образцов ПКО и ОКО по каналам HEX, FAM и ROX. Величина  $C_q$  соответствует количеству циклов ПЦР, при котором уровень флуоресценции превышает фоновый.
2. По величине  $C_q$  по каналу HEX ( $C_{qHEX}$ ) оценивают пригодность бис-ДНК для анализа. В случае, если значение  $C_{qHEX}$  бис-ДНК не превышает значение точки отсечения ( $TO_{HEX}$ ), указанное в паспорте качества набора, то образец бис-ДНК считается пригодным для анализа, а результат достоверным.
3. Оценивают значение  $C_q$  по каналу FAM ( $C_{qFAM}$ ) для клинического образца. Метилирование в области промотора гена *SEPT9* выявлено, если минимум в одном повторе из трёх значение  $C_{qFAM}$  меньше или равно заданному значению точки отсечения ( $TO_{FAM}$ ), указанному в паспорте качества к набору реагентов.
4. Оценивают значение  $C_q$  по каналу ROX ( $C_{qROX}$ ) для клинического образца. Метилирование в области промотора гена *SDC2* выявлено, если минимум в одном

повторе из трёх значение  $C_{q_{ROX}}$  меньше или равно заданному значению точки отсечения ( $TO_{ROX}$ ), указанному в паспорте качества к набору реагентов.

### 3 Аналитические и диагностические характеристики набора

#### 3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 2 пг/мкл метилированной ДНК в плазме крови.

#### 3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью набора реагентов понимается его способность одновременно специфически определять наличие метилирования в промоторных областях генов *SEPT9* и *SDC2*. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов для образцов ДНК, содержащих неметилированные области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2*.

Было проверено влияние потенциально интерферирующих веществ из следующих источников:

- 1) вещества, присутствующие в образце и не полностью удалённые при выделении ДНК: гемоглобин, общий белок крови, триглицериды, билирубин;
- 2) вещества, добавляемые во время подготовки образца: ЭДТА.

Интерферирующие вещества не влияют на результаты анализа в следующих концентрациях: альбумин – 51 мг/мл, билирубин – 35,1 мкмоль/л, гемоглобин – 5 мг/мл, триглицериды – 34,23 ммоль/л, ЭДТА – 20 мг/мл.

#### 3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении метилирования в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2*. Значение повторяемости результатов при определении метилирования в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* составило 100%, (интервал 91,19-100% 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 не выявлено расхождений в определении метилирования в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2*. Значение воспроизводимости результатов при

определении метилирования в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* составило 100% (интервал 91,19-100% с доверительной вероятностью 95%).

### 3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении колоректального рака и аденоматозных полипов на выборке из 242 образцов, из них 208 отрицательных образцов, составила 91,35% (190/208, доверительный интервал 86,67-94,79% с вероятностью 95%).

### 3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении колоректального рака на выборке из 242 образцов, из них 18 положительных образцов, составила 100% (18/18, доверительный интервал 81,47-100% с вероятностью 95%). Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении аденоматозных полипов на выборке из 242 образцов, из них 16 положительных образцов, составила 81,25% (13/16, доверительный интервал 54,35-95,95% с вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении колоректального рака и аденоматозных полипов на выборке из 242 образцов, из них 34 положительных образца, составила 91,18% (31/34, доверительный интервал 76,32-98,14% с вероятностью 95%).

### 3.6 Ограничения при применении

Необходимо хранить образцы крови при температуре 4°C и готовить плазму не позднее четырёх часов после забора крови. В процессе транспортировки и хранения образцов может происходить разрушение клеток крови, в результате чего ДНК клеток крови может контаминировать ДНК плазмы. Рекомендации по подготовке плазмы крови приведены в Приложении А.

Положительный результат анализа является предварительным и позволяет выявить пациентов из группы риска (с подозрением на колоректальный рак). Для подтверждения диагноза всем пациентам с подозрением на колоректальный рак рекомендуется выполнение колоноскопии со взятием биопсийного материала. Постановка диагноза исключительно на основании результатов проведенного анализа недопустима.

### 3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа – колоноскопия со взятием биопсийного материала. Референтные материалы отсутствуют.

## 4 Риски, связанные с применением набора реагентов

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

1. При заборе крови набрано недостаточное количество крови (менее, чем три полных вакутейнера объёмом от 8 мл), в результате недостаточное количество ДНК для анализа (возможный вред: отсутствие результата).
2. Приготовление плазмы позднее, чем через четыре часа после забора крови, или после замораживания крови, ошибки при приготовлении плазмы, что приводит к контаминации плазмы лейкоцитами (возможный вред: ложноотрицательный результат).
3. Дегградация компонентов ПЦР-смеси, ПКО, ОКО, инактивация Taq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).
4. Дегградация буфера К и буфера Н1 из-за нарушения условий хранения вскрытых пробирок с буферами К и Н1 (возможный вред: отсутствие результата).
5. Тестирование образцов ДНК менее чем в трёх повторах (возможный вред: ложноотрицательный результат).
6. Некорректная интерпретация результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат или ложноположительный результат).
7. Некорректная интерпретация результатов ПЦР в случае, когда персонал для определения величин  $C_q$  использует значение регрессии вместо порогового уровня для термоциклера с модулем CFX96 или порогового метода для амплификатора ДТпрайм (возможный вред: ложноотрицательный результат или ложноположительный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

Противопоказания: набор реагентов не предназначен для пациентов, которые хотят и могут пройти рутинные скрининговые тесты на колоректальный рак, рекомендованные министерством здравоохранения РФ.

Ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению, отсутствуют.

## 5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, соответствующих требованиям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» и СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
3. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.
4. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. Выделение ДНК и бисульфитную конверсию ДНК следует проводить в боксе микробиологической безопасности класса II. Постановку ПЦР следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
7. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Рекомендуется менять перчатки при переходе от выделения ДНК к постановке ПЦР и обратно.
8. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
9. 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.
10. Использовать ПЦР-смесь только с Taq ДНК-полимеразой, входящей в состав набора реагентов.
11. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных партий.
12. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.

13. Буферы LB и WB1 содержат детергенты, буферы K и T – соли неорганических кислот, буферы EB и NH – щелочь, буфер H1 – органическое соединение, которые могут вызвать раздражение. Избегать попадания на кожу, в глаза и на слизистые оболочки. При контакте немедленно промыть большим количеством воды (не менее 15 минут), при необходимости обратиться за медицинской помощью.
14. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СП 3.3686-21.
15. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1.4025-24 «Дезинфектология. Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях. Руководство».
16. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety datasheet) доступны по запросу.

## 6 Оборудование и материалы

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

Амплификатор планшетного типа с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени:

Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4М1, 4М3, 4М6, 5М1, 5М3, 5М6, 6М1, 6М3, 6М6, 4Х1, 5Х1, 6Х1 (РУ № ФСР 2011/10229, ООО «НПО ДНК-Технология») или термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнения: «С1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (РУ №ФСЗ 2008/01792, «Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

Аспиратор, например, аспиратор с сосудом-ловушкой FTA-1 (РУ № ФСЗ 2011/09791, ООО «Биосан», Латвия).

Бокс для ПЦР, например, бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» по ТУ 9443-004-51495026-2004 (РУ № ФСР 2010/07114, ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Бокс микробиологический, например, бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С» по ТУ 32.50.50-010-51495026-2020 в исполнении: БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 (NEOTERIC) (РУ № ФСР 2012/13259, ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Вортекс, например, вортекс персональный V-1 plus (РУ № ФСЗ 2011/09797, ООО «Биосан», Латвия).

Дозаторы переменного объема, например, дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (РУ № ФСР 2009/05681, АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия).

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-ротатор для пробирок диаметром 10-16 мм (1,5 мл, 2 мл, 5 мл), например, Мини-ротатор Bio RS-24 со стандартной платформой PRS-22, с принадлежностями (РУ № ФСЗ 2011/09794, ООО «Биосан», Латвия).

Термостат твердотельный, например, термостат типа «Драй-блок» TDB-120, вариант исполнения: I. Термостат TDB-120 с крышкой и термоблоком А-53 (РУ № РЗН 2018/7729, ООО «Биосан», Латвия).

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 с возможностью регулирования силы торможения, например, центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (РУ № ФСЗ 2008/01792, ООО «Биосан», Латвия).

## **6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов**

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

Наконечники универсальные, например, наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем. 3. Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл (РУ № ФСЗ 2012/12077, «Эксиджен, Инк.», США).

Перчатки медицинские, например, перчатки медицинские диагностические (смотровые) и хирургические одноразовые «Venovu» стерильные и нестерильные. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные смотровые, цвета: бирюзовый, синий, белый, голубой, сиреневый, зеленый, размеры: XS, S, M, L, XL (вид 185830) (РУ № ФСЗ 2012/12488, «ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия).

Пробирки, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro*. 10. Пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 штук.

13. Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом от 0,6 мл до 2,0 мл.  
17. Плашки для ПЦР на 96 лунок. 25. Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом от 5 мл до 50 мл. (РУ № ФСЗ 2012/11892, «Эксиджен, Инк.», США).

Штатив, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro*. 20. Штатив для пробирок, 80 ячеек. 22. Штатив для пробирок, 96 ячеек. (РУ № ФСЗ 2012/11892, «Эксиджен, Инк.», США).

Штатив магнитный, например, штатив лабораторный по ТУ 32.50.50-005-01813981-2020, вариант исполнения: 1. Магнитный штатив для работы с пробирками объемом 1,5/2,0; 5,0; 15,0 и 50,0 мл (РУ № РЗН 2022/16856, ООО «Компания Совтех», Россия).

## 7 Анализируемые пробы

В качестве материала для исследования используют плазму крови пациентов.

**ВНИМАНИЕ!** Хранить образцы крови при температуре 4°C и готовить плазму не позднее четырех часов после забора крови. В процессе транспортировки и хранения образцов может происходить разрушение клетки крови, в результате чего ДНК клеток крови может контаминировать внеклеточную ДНК плазмы. Рекомендации по приготовлению плазмы крови приведены в Приложении А.

## 8 Протокол выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови и проведения бисульфитной конверсии ДНК

### 8.1 Подготовка реагентов

8.1.1 Перед работой пробирку с магнитными частицами MNA необходимо тщательно встряхнуть на вортексе.

8.1.2 В пробирку с буфером DS добавить 35 мкл буфера NH. Тщательно перемешать и сбросить капли на вортексе. Приготовленный буфер следует использовать в течение суток.

**ВНИМАНИЕ!** Пробирки с буфером K и буфером N1 вскрывать непосредственно перед разведением.

8.1.3 В пробирку с буфером K добавить 35 мкл буфера NH и 1010 мкл буфера для разведения. Тщательно перемешать до полного растворения осадка. Полученный буфер K можно использовать в течение 14 суток, хранить при 4°C.

8.1.4 В пробирку с буфером N1 внести 1 мл буфера для разведения. Тщательно перемешать до полного растворения осадка. Готовый буфер N1 использовать в течение суток.

8.1.5 В пробирку с буфером Н2 внести 20 мкл буфера Н1 и тщательно перемешать. Буфер Н2 следует использовать в течение 30 суток, хранить при 4°C.

8.1.6 Перед работой с клиническими образцами необходимо подготовить по одному контрольному образцу ПКО и ОКО. Для этого предварительно разморозить пробирки с образцами ПКО и ОКО в течение часа при комнатной температуре (от 18°C до 25°C), либо 5-10 мин при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Перемешать содержимое пробирки переворачиванием 5-10 раз.

## 8.2 Выделение ДНК из плазмы крови

8.2.1 Внести по **5 мл** плазмы крови в пробирки объёмом 5 мл.

**ВНИМАНИЕ!** Параллельно с пробоподготовкой клинических образцов обязательно проводить аналогичную процедуру для контрольных образцов ПКО и ОКО.

8.2.2 Добавить к каждому образцу **1 мл** лизирующего буфера **LB**. Тщательно перемешать, переворачивая пробирку 5-10 раз.

8.2.3 Инкубировать 20 мин при комнатной температуре.

8.2.4 Встряхнуть пробирку с магнитными частицами на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек. Добавить к образцам по **5 мкл суспензии магнитных частиц**. Тщательно перемешать, переворачивая пробирку 5-10 раз.

8.2.5 Вращать 10 минут при комнатной температуре на мини-ротаторе на максимальной скорости.

8.2.6 Поместить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 минуты, убедиться, что частицы собрались на стенках пробирок. Аккуратно, не захватывая частицы, полностью удалить супернатант.

**ВНИМАНИЕ!** Удалять супернатант здесь и далее с использованием аспиратора или автоматической пипетки.

8.2.7 Внести в пробирки по **500 мкл** промывочного буфера **WB1**. Пробирки тщательно встряхнуть и перенести суспензию в чистые промаркированные пробирки объёмом 1,5 мл. Тщательно перемешать на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек.

8.2.8 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант, не вынимая пробирки из штатива.

8.2.9 Внести в пробирки по **500 мкл** промывочного буфера **WB2**. Тщательно перемешать на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек.

8.2.10 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант, не вынимая пробирки из штатива.

8.2.11 Внести в пробирки по **500 мкл** промывочного буфера **WB2**. Тщательно перемешать на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек. На данном этапе ДНК на частицах в буфере WB2 может храниться до 24 часов при температуре 4°C.

### 8.3 Бисульфитная конверсия ДНК

8.3.1 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант.

8.3.2 Добавить к образцам с магнитными частицами **55 мкл буфера DS**, осторожно суспендировать частицы в буфере и инкубировать в термостате при температуре 80°C в течение 5 минут.

8.3.3 Достать образцы из термостата, перемешать и сбросить капли на вортексе. Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Перенести **55 мкл супернатанта** в новые промаркированные пробирки объёмом 1,5 мл.

8.3.4 Образцы инкубировать 10 минут в термостате при температуре 75°C.

8.3.5 Достать образцы из термостата и последовательно добавить **130 мкл буфера K** и **10 мкл буфера H2**, тщательно перемешать. Инкубировать 2 часа при температуре 80°C в термостате.

8.3.6 Достать пробирки с образцами из термостата и сбросить капли на вортексе в течение 1 мин.

8.3.7 Добавить в пробирки с образцами по **250 мкл буфера T**.

8.3.8 Пробирку с магнитными частицами MNA необходимо тщательно встряхнуть на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек.

8.3.9 Добавить в пробирки с образцами по **5 мкл магнитных частиц**.

8.3.10 Инкубировать 10 мин при комнатной температуре и при постоянном перемешивании на мини-ротаторе.

8.3.11 Поместить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 минуты, убедиться, что частицы собрались на стенках пробирок. Осторожно удалить супернатант, не захватывая частицы.

8.3.12 Внести в пробирки по **500 мкл** промывочного буфера **WB2**. Тщательно перемешать на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек.

8.3.13 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант, не вынимая пробирки из штатива.

8.3.14 Внести в пробирки по **100 мкл буфера DS** и тщательно встряхнуть на вортексе. Инкубировать образцы в термостате при 37°C в течение 15 минут.

8.3.15 Сбросить капли на вортексе и добавить **400 мкл буфера T**, тщательно перемешать и инкубировать 5 минут при комнатной температуре.

- 8.3.16 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант, не вынимая пробирки из штатива.
- 8.3.17 Внести в пробирки по **500 мкл** промывочного буфера **WB2**. Тщательно перемешать на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек.
- 8.3.18 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант.
- 8.3.19 Внести в пробирки по **500 мкл** промывочного буфера **WB2**. Тщательно перемешать на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек.
- 8.3.20 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант.
- 8.3.21 Добавить **42 мкл** элюирующего буфера **EB**. Тщательно перемешать.
- 8.3.22 Инкубировать в термостате при температуре 80°C в течение 5 минут.
- 8.3.23 Достать образцы из термостата, перемешать и сбросить капли на вортексе. Поместить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 минуты, чтобы магнитные частицы собрались на стенках пробирок. Отобрать и перенести элюат в чистые, промаркированные пробирки объемом 1,5 мл, не захватывая сорбент.
- 8.3.24 Добавить к элюату по **8 мкл буфера T**. Образцы перемешать и сбросить капли на вортексе. Полученные образцы бис-ДНК использовать для постановки ПЦР в реальном времени.

## 9 Протокол выявления метилирования ДНК в области промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* методом ПЦР в реальном времени

### 9.1 Подготовка реагентов

- 9.1.1 Разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) ПЦР-смесь SEPT9-SDC2, убедиться, что раствор полностью растаял.
- 9.1.2 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 бис-ДНК клинических образцов в каждой постановке тестируют бис-ДНК контрольных образцов ПКО и ОКО. Все клинические и контрольные образцы бис-ДНК тестируют в трёх повторах.

## 9.2 Приготовление смеси для ПЦР

9.2.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических и контрольных образцов ДНК с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 3. Для тестирования N клинических образцов ДНК, контрольных образцов ПКО и ОКО в трёх повторах, необходимо увеличить объёмы в  $(N+2+1)*3$  раз.

Таблица 3. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь SEPT9-SDC2	13,4 мкл
Taq ДНК-полимераза	1,6 мкл

9.2.2 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 8.2.1): внести в пробирку расчётное количество ПЦР-смеси SEPT9-SDC2, добавить Taq ДНК-полимеразу и тщательно перемешать на вортексе 3-5 сек. Реакционная смесь готова.

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

9.2.3 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР.

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

9.2.4 Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой.

9.2.5 Внести в пробирки с реакционной смесью:

- по 15 мкл бис-ДНК клинических образцов;
- по 15 мкл бис-ДНК ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 15 мкл бис-ДНК ПКО в пробирки для положительного контроля.

Пример расположения шести клинических и контрольных образцов приведен на рисунке 1.

	1	2	3
<b>A</b>	бис-ДНК1	бис-ДНК1	бис-ДНК1
<b>B</b>	бис-ДНК2	бис-ДНК2	бис-ДНК2
<b>C</b>	бис-ДНК3	бис-ДНК3	бис-ДНК3
<b>D</b>	бис-ДНК4	бис-ДНК4	бис-ДНК4
<b>E</b>	бис-ДНК5	бис-ДНК5	бис-ДНК5
<b>F</b>	бис-ДНК6	бис-ДНК6	бис-ДНК6
<b>G</b>	бис-ДНК ОКО	бис-ДНК ОКО	бис-ДНК ОКО
<b>H</b>	бис-ДНК ПКО	бис-ДНК ПКО	бис-ДНК ПКО

Рисунок 1. Пример расположения клинических и контрольных образцов

9.2.6 Центрифугировать 3 мин при 1500 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.2.7 Установить стрипы в блок термоциклера.

### 9.3 Программирование и запуск термоциклера

9.3.1 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование проводить в соответствии с руководством по эксплуатации прибора.

9.3.2 Задать объём реакционной смеси 30 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	3 мин	нет
5	95°C	10 сек	
	58,5°C	60 сек	
55	95°C	10 сек	да
	58,5°C	60 сек	

9.3.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- HEX – регистрация сигнала при амплификации ДНК контрольного локуса актина;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента, соответствующего метилированной области промотора гена *SEPT9*;
- ROX – регистрация сигнала при амплификации фрагмента, соответствующего метилированной области промотора гена *SDC2*.

9.3.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами и запустить ПЦР.

## 10 Анализ результатов

### 10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Выбрать режим определения величин  $C_q$ : при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот «C1000 Touch» с модулем CFX96 выбрать режим *single threshold* с автоматической установкой пороговой линии, а также коррекцию дрефта флуоресценции («Apply Fluorescence Drift Correction»), для получения величин  $C_q$  выставить ручную пороговый уровень 100 для канала HEX, для каналов FAM и ROX – автоматический режим. При применении амплификатора «ДТпрайм» использовать геометрический метод. Для оценки достоверности эксперимента необходимо оценить амплификацию контрольных образцов набора.

10.1.2 Проверить величины  $C_q$  по каналам FAM, ROX и HEX для ПКО и ОКО (таблица 5). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа метилирования в областях промоторов генов *SEPT9* и *SDC2* только в том случае, если величины  $C_q$  для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

- для ОКО и ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу HEX и определяются значения  $C_{qHEX}$  меньше или равно  $QC_{HEX}$  (указаны в паспорте качества);
- для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналам FAM и ROX, не определяется значение  $C_{qFAM}$ ,  $C_{qROX}$ ;
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение  $C_{qFAM}$ , меньше или равно  $QC_{FAM}$  (указано в паспорте качества).
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение  $C_{qROX}$  меньше или равно  $QC_{ROX}$  (указано в паспорте качества).

Таблица 5. Допустимые значения  $C_q$  контрольных образцов

Образец	Значение $C_{qHEX}$	Значение $C_{qFAM}$	Значение $C_{qROX}$
ОКО	$\leq QC_{HEX}$	Не определено (0,0)	Не определено (0,0)
ПКО	$\leq QC_{HEX}$	$\leq QC_{FAM}$	$\leq QC_{ROX}$

Если величины  $C_q$  контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если величины  $C_q$  контрольных образцов повторно выходят за пределы допустимых значений, то обратиться к производителю. Если значения допустимы, перейти к анализу результатов амплификации клинических образцов.

## 10.2 Анализ результатов ПЦР в реальном времени на наличие метилирования ДНК в областях промоторов генов *SEPT9* и *SDC2*

10.2.1 Для каждого клинического образца должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу HEX и определяться значение  $C_q$  ( $C_{q_{HEX}}$ ). Сравнить значение  $C_q$  образца по каналу HEX со значением точки отсечения  $TO_{HEX}$  для соответствующего амплификатора, которое указано в паспорте качества набора реагентов. Если для всех трёх повторов значение  $C_{q_{HEX}} \leq TO_{HEX}$ , то образец пригоден для анализа. Если значение  $C_{q_{HEX}}$  не определено или  $C_{q_{HEX}} > TO_{HEX}$  в одном или более из трёх повторов, то образец не пригоден для анализа. Необходимо повторить анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

10.2.2 Метилирование в области промотора гена *SEPT9* определяют по уровню флуоресценции по каналу FAM. Для этого сравнивают значения  $C_q$  образца по каналу FAM ( $C_{q_{FAM}}$ ) со значением точки отсечения  $TO_{FAM}$  для соответствующего амплификатора, которое указано в паспорте качества набора реагентов. Если для исследуемого образца в одном или более из трёх повторов значение  $C_{q_{FAM}} \leq TO_{FAM}$ , то метилирование в области промотора гена *SEPT9* выявлено (положительный результат анализа). Если для исследуемого образца для всех трёх повторов значение  $C_{q_{FAM}}$  не определено или  $C_{q_{FAM}} > TO_{FAM}$ , то метилирование в области промотора гена *SEPT9* не выявлено (отрицательный результат анализа).

10.2.3 Метилирование в области промотора гена *SDC2* определяют по уровню флуоресценции по каналу ROX. Для этого сравнивают значения  $C_q$  образца по каналу ROX ( $C_{q_{ROX}}$ ) со значением точки отсечения  $TO_{ROX}$  для соответствующего амплификатора, которое указано в паспорте качества. Если для исследуемого образца в одном или более из трёх повторов  $C_{q_{ROX}} \leq TO_{ROX}$ , то метилирование в области промотора гена *SDC2* выявлено (положительный результат анализа). Если для исследуемого образца для всех трёх повторов значение  $C_{q_{ROX}}$  не определено или  $C_{q_{ROX}} > TO_{ROX}$ , то метилирование в области промотора гена *SDC2* не выявлено (отрицательный результат анализа).

## 11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

### 11.1 Условия хранения

11.1.1 Условия хранения указаны в таблице 6.

Таблица 6. Условия хранения и транспортировки набора реагентов

№	Наименование реагента	Условия хранения	Условия транспортировки
<b>Коробка 1</b>			
1	Магнитные частицы MNA	От 2°C до 8°C Не подвергать замораживанию!	От 2°C до 25°C Не подвергать замораживанию!
2	Лизирующий буфер LB		
3	Промывочный буфер WB1		
4	Промывочный буфер WB2		
5	Буфер DS		
6	Буфер К (в сухом виде)		
7	Буфер NH		
8	Буфер H1 (в сухом виде)		
9	Буфер H2		
10	Буфер T		
11	Буфер для разведения		
12	Элюирующий буфер EB		
<b>Коробка 2</b>			
13	ПКО	От минус 18°C до минус 25°C Не допускать проникновения света!	Не выше минус 18°C Не допускать проникновения света!
14	ОКО		
15	ПЦР-смесь SEPT9-SDC2		
16	Тақ ДНК-полимераза		

11.1.2 Срок годности набора 6 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

### 11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допустимая температура перевозки указана в таблице 6.

11.2.2 Рекомендуется транспортирование коробки 1 в термоконтейнерах с хладоэлементами для сохранения температуры от 2°C до 8°C (ХТЛ-3, ООО «Термологика» или аналогичные), коробки 2 – в термоконтейнерах с хладоэлементами для сохранения температуры минус 20°C (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

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

### 11.3 Условия эксплуатации

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

11.3.2 Соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

### 11.4 Условия утилизации

11.4.1 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.

## 12 Гарантийные обязательства

### 12.1 Гарантии производителя

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

### 12.2 Рекламации

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

Рекламации следует направлять в письменном виде производителю ООО «БиоЛинк».

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

Телефон: +7 (383) 209-32-40

Электронная почта: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

## 13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для анализа указанного количества образцов		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер партии
	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 приготовлению плазмы крови

1. Кровь забрать в три вакутейнера объёмом 8-10 мл с раствором КЗ ЭДТА, например, пробирки Improvacuter с КЗ ЭДТА объёмом 9 мл, («Гуанчжоу Импрув Медикал Инструментс Ко., Лтд», Китай). При заборе следить, чтобы каждая пробирка полностью заполнилась кровью. Немедленно после забора перемешать, переворачивая пробирку с кровью 8-10 раз.

**ВНИМАНИЕ!** Хранить до приготовления плазмы в холодильнике при температуре 4°C, не замораживать. Не позднее 4 часов после забора крови приготовить плазму.

2. Центрифугировать пробирки с кровью в течение 10 мин при 1500g при температуре от 4°C до 30°C. Кровь должнаделиться на три слоя: плазма сверху, эритроциты внизу, белая прослойка лейкоцитов между плазмой и эритроцитами. **ВНИМАНИЕ!** Перед центрифугированием отключить тормоз центрифуги чтобы лейкоциты не взбалтывались при торможении.

3. Собрать плазму в пробирку на 15 мл с коническим дном, не захватывая лейкоциты. **ВНИМАНИЕ!** Оставить над лейкоцитами слой плазмы толщиной 5 мм, чтобы не контаминировать плазму клетками!

4. Центрифугировать пробирки с плазмой в течение 10 мин при 1500g при температуре от 4°C до 30°C. **ВНИМАНИЕ!** Перед центрифугированием отключить тормоз центрифуги чтобы лейкоциты не взбалтывались при торможении. После центрифугирования в пробирках может наблюдаться небольшой белый или белорозовый осадок клеток. Собрать чистую плазму в новые пробирки на 5 мл, не захватывая осадок. **ВНИМАНИЕ!** Оставить над осадком слой плазмы толщиной 5-10 мм, чтобы не контаминировать плазму клетками!

5. Плазму хранить до выделения ДНК при температуре 4°C до 24 часов, при температуре от минус 15°C до минус 25°C до 30 дней или при температуре минус 70°C до 12 месяцев.

## Библиография

1. Septins / M. P. Estey, M. S. Kim, W. S. Trimble // *Current Biology*. – 2011. – Vol. 21, N 10. – P. R384-R387. – DOI: 10.1016/j.cub.2011.03.067
2. *MSF* (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of *MLL*, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25) / M. Osaka, J. D. Rowley, N. J. Zeleznik-Le // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96, N 11. – P. 6428-6433. – DOI: 10.1073/pnas.96.11.6428
3. Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors / S. E. Russell, M. A. McIlhatton, J. F. Burrows, et al. // *Cancer Res*. – 2000. – Vol. 60, N 17. – P. 4729-34.
4. The Septin 9 (*MSF*) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines / C. Montagna, M. S. Lyu, K. Hunter, et al. // *Cancer Res*. – 2003. – Vol. 63, N 9. – P. 2179-87.
5. Emerging roles of syndecan 2 in epithelial and mesenchymal cancer progression / M. Mytilinaiou, D. Nikitovic, A. Berdiaki, et al. // *IUBMB Life*. – 2017. – Vol. 69, N 11. – P. 824-833. – DOI: 10.1002/iub.1678
6. Circulating methylated *SEPT9* DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer / T. Devos, R. Tetzner, F. Model, et al. // *Clinical Chemistry*. – 2009. – Vol. 55, N 7. – P. 1337-1346. – DOI: 10.1373/clinchem.2008.115808
7. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer / J. D. Warren, W. Xiong, A. M. Bunker, et al. // *BMC Medicine*. – 2011. – Vol. 9:133. – P. 1-9. – DOI: 10.1186/1741-7015-9-133
8. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening / C. Lofton-Day, F. Model, T. Devos, et al. // *Clinical Chemistry*. – 2008. – Vol. 54, N 2. – P. 414-423. – DOI: 10.1373/clinchem.2007.095992
9. Analysis of *SDC2* and *SEPT9* promoters methylation in plasma cfDNA to detect colorectal and precancerous lesions / V. Borobova, A. Aksamentov, D. Sazonov, et al // *Explor Med*. – 2025. – Vol. 6. – P. 1001322. – DOI: 10.37349/emed.2025.1001322
10. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands / M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – Vol. 89, N 5. – P. 1827-1831. – DOI: 10.1073/pnas.89.5.1827
11. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis / H. G. Hernández, M. Y. Tse, S. C. Pang, et al. // *BioTechniques*. – 2013. – Vol. 55, N 4. – P. 181-197. – DOI: 10.2144/000114087







**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](http://biolinklab)