



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

 Корниенко А.А.

24 марта 2022 г.



Набор реагентов для выявления метилирования в области
промотора гена *SEPT9* методом ПЦР в реальном времени

"Real-time-PCR-SEPT9-Met"

по ТУ 21.20.23-008-57201404-2021

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Содержание

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

11	Условия хранения, транспортирования и эксплуатации	20
11.1	Условия хранения.....	20
11.2	Условия транспортирования.....	21
11.3	Условия эксплуатации	22
12	Гарантийные обязательства	22
13	Маркировка	23
	Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по приготовлению плазмы крови ..	24
	Библиография	25

Введение

Ген *SEPT9* кодирует ГТФ-связывающий белок, формирующий филаменты, задействованные в цитокинезе, поддержании структуры мембран и организации внутриклеточного пространства [1]. Нарушения регуляции *SEPT9* обнаружены при различных онкологических заболеваниях [2–7]. Аберрантное метилирование ДНК в области промотора гена *SEPT9* является маркером колоректального рака [5-7]. Выявление метилированных фрагментов ДНК во внеклеточной ДНК плазмы крови позволяет предположить колоректальный рак. При положительном результате анализа требуется дополнительное обследование (колоноскопия).

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови, бисульфитной конверсии ДНК и выявления метилирования ДНК в области промотора гена *SEPT9* методом ПЦР в реальном времени. 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.

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, 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 промотора гена *SEPT9* методом ПЦР в реальном времени "Real-time-PCR-SEPT9-Met" по ТУ 21.20.23-008-57201404-2021» представлен в одном варианте исполнения: Набор реагентов на 48 образцов "Real-time-PCR-SEPT9-Met (48)".

2.2 Состав набора реагентов

Набор содержит пробирки и флаконы с реагентами для выделения ДНК и проведения бисульфитной конверсии в коробке 1 (таблица 1), пробирки и флаконы с реагентами для проведения ПЦР в реальном времени в коробке 2 (таблица 2), инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Компоненты набора для выделения ДНК и бисульфитной конверсии

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём / масса
1	красная	Магнитные частицы MNA	480 мкл
2	бесцветная	Лизирующий буфер LB	48 мл
3	бесцветная	Промывочный буфер WB1	24 мл
4	бесцветная	Промывочный буфер WB2	2 x 60 мл
5	белая	Буфер DS	6 x 1365 мкл
6	розовая	Буфер К (в сухом виде)	6 x 537,5 мг
7	бирюзовая	Буфер NH	600 мкл
8	синяя	Буфер Н1 (в сухом виде)	6 x 40 мг
9	голубая	Буфер Н2	6 x 720 мкл
10	бесцветная	Буфер Т	32 мл
11	бесцветная	Буфер для разведения	15 мл
12	зелёная	Элюирующий буфер EB	2 x 1400 мкл
13	бесцветная	ВКП-ПКО ¹	6 x 5 мл
14	бесцветная	ВКП-ОКО ²	6 x 5 мл

¹) Положительный контрольный образец ВКП-ПКО содержит смесь фрагментов ДНК, соответствующих метилированной и неметилированной промоторной области гена *SEPT9* в растворе, имитирующем плазму крови человека.

²) Отрицательный контрольный образец ВКП-ОКО содержит фрагмент ДНК, соответствующий неметилированной промоторной области гена *SEPT9* в растворе, имитирующем плазму крови человека.

Таблица 2. Компоненты набора для проведения ПЦР в реальном времени

№	Цвет крышки	Реагент	Объём
15	жёлтая	ПЦР-смесь SEPT9	2 x 1100 мкл
16	синяя	Taq ДНК-полимераза	120 мкл

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

2.3 Число анализируемых проб

Количество реагентов достаточно для анализа 48 образцов:

- 1) выделения ДНК из 48 образцов, содержащих по 5 мл плазмы крови каждый;
- 2) проведения бисульфитной конверсии 48 образцов;
- 3) постановки ПЦР для анализа 48 образцов с контрольными образцами.

Указанное количество реагентов позволяет проанализировать 46 клинических образцов с контрольными образцами ВКП-ПКО и ВКП-ОКО в одной постановке или 36 клинических образцов и 12 контрольных образцов в шести постановках по 6 клинических образцов с контрольными образцами ВКП-ПКО и ВКП-ОКО в каждой постановке.

2.4 Принцип действия набора

Набор предназначен для выявления метилирования ДНК в области промотора гена *SEPT9* 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 из плазмы используют сорбент, состоящий из магнитных частиц со специальным покрытием, 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 [8]. Оценка представленности неконвертированного цитозина позволяет сделать вывод об уровне ДНК-метилирования в конкретном участке ДНК [9]. 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 цитозинов в области промоторной области гена *SEPT9*. Реакционные смеси содержат специфические праймеры для амплификации контрольного локуса в области гена актина и промоторной области гена *SEPT9*. Детекция ПЦР-продуктов осуществляется в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan-зондов, меченных флуорофорами. Для детекции ПЦР-продукта контрольного локуса используют TaqMan-зонд, меченный флуорофором VIC. Для детекции уровня метилирования промоторной области гена *SEPT9* используют TaqMan зонд, меченный флуорофором FAM. ПЦР-смеси состоят из всех необходимых реагентов за исключением Taq ДНК-полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

В состав набора входят положительный (ВКП-ПКО) и отрицательный (ВКП-ОКО) контрольные образцы, которые необходимы, чтобы оценить корректность прохождения всех стадий анализа. При проведении исследования на первом этапе проводят выделение и бисульфитную конверсию контрольных образцов ВКП-ПКО и ВКП-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 ВКП-ПКО и бис-ДНК ВКП-ОКО. Каждый из клинических и контрольных образцов тестируют в трёх повторях.

Анализ результатов ПЦР:

1. Сначала оценивают достоверность результатов ПЦР, для этого проверяют значения C_t по каналам VIC и FAM для контрольных образцов ВКП-ПКО и ВКП-ОКО. Величина C_t соответствует количеству циклов ПЦР, при котором кривая флуоресценции для данного образца ДНК пересекает заданный пороговый уровень.
2. По величине C_t по каналу VIC оценивают пригодность бис-ДНК для анализа. В случае, если значение $C_{t_{VIC}}$ бис-ДНК не превышает значение точки отсечения (TO_{VIC}), указанное в паспорте качества набора, то образец бис-ДНК считается пригодным для анализа, а результат достоверным.
3. Оценивают значение C_t по каналу FAM для клинического образца. Метилирование в области промотора гена *SEPT9* выявлено, если минимум в одном повторе из трёх значение $C_{t_{FAM}}$ меньше или равно заданному значению точки отсечения (TO_{FAM}), указанному в паспорте качества к набору реагентов.

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 20 пг/мкл метилированной ДНК.

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью набора реагентов понимается его способность определять наличие метилирования в промоторной области гена *SEPT9*. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов для образцов ДНК, содержащих неметилированную область промотора гена *SEPT9*.

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. Значение повторяемости 100% (интервал 83,16-100% 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. Значение воспроизводимости 100% (интервал 83,16-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов в клинических испытаниях на выборке из 148 образцов составила 98,2% (интервал 93,64-99,78% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов в клинических испытаниях на выборке из 148 образцов составила 70,3% (интервал 53,02-84,13% с доверительной 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 приготовлению 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. Недопустима постановка диагноза исключительно на основании результатов анализа.

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. Дegradaция компонентов ПЦР-смеси, ВПК-ПКО, ВПК-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. Дegradaция 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 повторях (возможный вред: ложноотрицательный результат).
6. Интерпретация не валидных результатов ПЦР в случаях, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный 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 клинико-диагностической лаборатории. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
8. Использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.

9. Использовать ПЦР-смесь только с Taq ДНК-полимеразой, входящей в состав набора реагентов.
10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
12. Буферы LB и WB1 содержат детергенты; буфер EB, буфер DS, буфер NH содержат щелочь. Буфер K, H1, H2, и T содержат соли неорганических, органических кислот и органические соединения, 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.
13. 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.
14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
15. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21. **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.
16. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety datasheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Аспиратор с сосудом-ловушкой FTA-1 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004 (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.

Мини-ротатор Bio RS-24 со стандартной платформой PRS-22 для пробирок диаметром 10-16 мм (1,5 мл, 2 мл, 5 мл) (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

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 ХМ-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 или центрифуга лабораторная с охлаждением LMC-4200R с принадлежностями (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование с возможностью регулирования силы торможения.

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

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

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

Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 5 мл и 15 мл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

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.

Ш-татив 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 (ООО «Компания Совтех», Россия) или аналогичные.

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

8.1 Подготовка реагентов

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

В пробирку с буфером DS добавить 35 мкл буфера NH. Приготовленный буфер следует использовать в течение суток.

ВНИМАНИЕ! Пробирки с буфером K и буфером H1 вскрывать непосредственно перед разведением.

В пробирку с буфером K добавить 35 мкл буфера NH и 1010 мкл буфера для разведения. Тщательно перемешать и добиться полного растворения соли. Буфер K следует использовать в течение 14 суток.

В пробирку с буфером H1 внести 1 мл буфера для разведения. Тщательно перемешать и добиться полного растворения соли.

В пробирку с буфером H2 внести 20 мкл буфера H1 и тщательно перемешать. Буфер H2 следует использовать в течение 30 суток.

Перед работой с клиническими образцами необходимо подготовить по 1 контрольному образцу ВКП-ПКО и ВКП-ОКО. Для этого предварительно разморозить пробирки с образцами ВКП-ПКО и ВКП-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 ВКП-ПКО и ВКП-ОКО.

8.2.2 Добавить к каждому образцу **1 мл** лизирующего раствора **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 объемом 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

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 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Перенести **55 мкл** супернатанта в новые промаркированные пробирки объемом 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 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 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 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**. Полученные образцы использовать далее для постановки ПЦР в реальном времени. При необходимости образцы можно хранить при температуре минус 20°C в течение недели, либо немедленно перейти к процедуре постановки ПЦР в реальном времени.

9 Протокол выявления метилирования ДНК в области промотора гена *SEPT9* методом ПЦР в реальном времени

9.1 Подготовка реагентов

Разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) ПЦР-смесь SEPT9, убедиться, что раствор полностью растаял. 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 Taq 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 ВКП-ПКО и ВКП-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 ВКП-ПКО и ВКП-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	14,2 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,8 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, добавить Taq ДНК-полимеразу и тщательно перемешать пипетированием (не использовать вортекс). Реакционная смесь готова.

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

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

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

	1	2	3
A	бис-ДНК1	бис-ДНК1	бис-ДНК1
B	бис-ДНК2	бис-ДНК2	бис-ДНК2
C	бис-ДНК3	бис-ДНК3	бис-ДНК3
D	бис-ДНК4	бис-ДНК4	бис-ДНК4
E	бис-ДНК5	бис-ДНК5	бис-ДНК5
F	бис-ДНК6	бис-ДНК6	бис-ДНК6
G	бис-ДНК ВКП-ОКО	бис-ДНК ВКП-ОКО	бис-ДНК ВКП-ОКО
H	бис-ДНК ВКП-ПКО	бис-ДНК ВКП-ПКО	бис-ДНК ВКП-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 термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование проводить в соответствии с руководством по эксплуатации прибора.

9.3.2 Задать объем 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:

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

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 Для оценки достоверности эксперимента необходимо оценить амплификацию контрольных образцов набора. Для этого необходимо 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 для канала VIC и 200 для канала FAM.

10.1.2 Проверить величины C_t по каналам FAM и VIC для ВКП-ПКО и ВКП-ОКО (таблица 5). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа метилирования в области промотора гена *SEPT9* только в том случае, если величины C_t для ВКП-ПКО и ВКП-ОКО имеют допустимые значения:

- для ВКП-ОКО и ВКП-ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу VIC и определяются значения C_{tVIC} меньше или равно QC_{VIC} (указано в паспорте качества и на упаковке набора);
- для ВКП-ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение C_{tFAM} ;
- для ВКП-ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение C_{tFAM} меньше или равно QC_{FAM} (указано в паспорте качества и на упаковке набора).

Таблица 5. Допустимые значения C_t контрольных образцов

Образец	Значение $C_{t_{VIC}}$	Значение $C_{t_{FAM}}$
ВКП-ОКО	$\leq QC_{VIC}$	Не определено (0,0)
ВКП-ПКО	$\leq QC_{VIC}$	$\leq QC_{FAM}$

Если величины C_t контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если величины C_t 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 области промотора гена *SEPT9*

10.2.1 Для каждого клинического образца должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу VIC и определяться значение C_t ($C_{t_{VIC}}$). Сравнить значение C_t образца по каналу VIC со значением точки отсечения TO_{VIC} , которое указано в паспорте качества набора и на упаковке набора. Если для всех трёх повторов значение $C_{t_{VIC}} \leq TO_{VIC}$, то образец пригоден для анализа. Если значение $C_{t_{VIC}}$ не определено или $C_{t_{VIC}} > TO_{VIC}$ 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 гена *SEPT9* определяют по уровню флуоресценции по каналу FAM. Для этого сравнивают значения C_t образца по каналу FAM ($C_{t_{FAM}}$) со значением точки отсечения TO_{FAM} , которое указано в паспорте качества набора и на упаковке набора. Если для исследуемого образца в одном или более из трёх повторов значение $C_{t_{FAM}} \leq TO_{FAM}$, то метилирование в области промотора гена *SEPT9* выявлено (положительный результат анализа). Если для исследуемого образца для всех трёх повторов значение $C_{t_{FAM}}$ не определено или $C_{t_{FAM}} > TO_{FAM}$, то метилирование в области промотора гена *SEPT9* 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 набора реагентов

№	Наименование реагента	Условия хранения
Коробка 1		
1	Магнитные частицы MNA	От 2°C до 8°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	
Коробка 2		
13	ВКП-ПКО	От минус 18°C до минус 25°C Не допускать проникновения света!
14	ВКП-ОКО	
15	ПЦР-смесь SEPT9	
16	Тaq 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 7.

Таблица 7. Условия транспортировки набора реагентов

№	Наименование реагента	Условия транспортировки
Коробка 1		
1	Магнитные частицы MNA	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	
Коробка 2		
13	ВКП-ПКО	Не выше минус 18°C Не допускать проникновения света!
14	ВКП-ОКО	
15	ПЦР-смесь SEPT9	
16	Taq ДНК-полимераза	

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.

12 Гарантийные обязательства

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

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

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

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

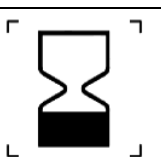
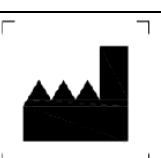
Телефон: +7 (383) 209-32-40

Электронная почта: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

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

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. Estey M.P., Kim M.S., Trimble W.S. Septins. // *Current Biology*. 2011. Vol. 21, № 10. P. R384–R387.
2. Osaka M., Rowley J.D., Zeleznik-Le N.J. 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). // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999. Vol. 96, № 11. P. 6428–6433.
3. Russell S.E. et al. Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. // *Cancer research*. 2000. Vol. 60, № 17. P. 4729–4734.
4. Montagna C. et al. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. // *Cancer research*. 2003. Vol. 63, № 9. P. 2179–2187.
5. deVos T. et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. // *Clinical chemistry*. 2009. Vol. 55, № 7. P. 1337–1346.
6. Warren J.D. et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. // *BMC medicine*. BioMed Central Ltd, 2011. Vol. 9, № 1. P. 133.
7. Lofton-Day C. et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. // *Clinical chemistry*. 2008. Vol. 54, № 2. P. 414–423.
8. Frommer M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992. Vol. 89, № 5. P. 1827–1831.
9. Hernández H.G. et al. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. // *BioTechniques*. 2013. Vol. 55, № 4. P. 181–197.

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