



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

Корниенко А.А.

26 мая 2026 г.



Набор реагентов для выявления пропуска экзона 14  
в гене *MET* методом полимеразной цепной реакции  
с обратной транскрипцией в режиме реального времени

(ОТ-ПЦР) **"RT-PCR-METex14"**

по ТУ 20.59.52-024-57201404-2025

**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.....	5
2.5 Принцип действия набора .....	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора.....	6
3.1 Предел обнаружения.....	6
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ.....	6
3.3 Характеристики аналитической эффективности .....	6
3.4 Диагностическая специфичность .....	7
3.5 Диагностическая чувствительность .....	7
3.6 Ограничения при применении .....	7
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа.....	7
4 Риски, связанные с применением набора реагентов .....	7
5 Меры предосторожности.....	8
6 Оборудование и материалы.....	9
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов .....	9
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов.....	11
7 Анализируемые пробы.....	11
8 Проведение анализа .....	12
8.1 Подготовка реагентов .....	12
8.2 Приготовление смеси для ОТ-ПЦР .....	12
8.3 Программирование и запуск амплификатора .....	14
9 Анализ результатов .....	15
9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР.....	15
9.2 Анализ результатов ОТ-ПЦР на наличие мутации METex14 .....	16
10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации.....	18
10.1 Условия хранения.....	18
10.2 Условия транспортирования .....	18
10.3 Условия эксплуатации .....	18
10.4 Условия утилизации.....	18

11	Гарантийные обязательства .....	19
12	Маркировка .....	20
	Библиография.....	21
	Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по выделению РНК из парафиновых блоков .....	22
	Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel».....	23
	Обработка результатов для термоциклера «С1000 Touch» с модулем «CFX96».	23
	Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм».....	25
	Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных с помощью шаблона в программе «MS Office Excel».....	27
	Приложение Г (рекомендуемое) Примеры плавущего фона флуоресценции .....	29

## Введение

Ген *MET* кодирует рецептор фактора роста гепатоцитов, который регулирует пролиферацию, выживание и инвазию клеток. Мутация METex14 вызывает нарушение сплайсинга матричной РНК, приводящее к пропуску экзона 14, что стабилизирует белок MET и усиливает его тирозинкиназную активность.

Эта мутация встречается в 3-4% случаев немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ). Опухоли с мутацией METex14 чувствительны к ингибиторам тирозинкиназы MET, таким как препараты капматиниб, тепотиниб, кризотиниб [1-5].

В соответствии с рекомендациями российского общества клинической онкологии RUSSCO «Немелкоклеточный рак лёгкого» и клиническими рекомендациями «Злокачественное новообразование бронхов и лёгкого» молекулярно-генетический анализ на мутацию METex14 рекомендован пациентам с неплоскоклеточным НМРЛ при неоперабельной III стадии и IV стадии («обязательный объем тестирования»).

Для лечения пациентов с местнораспространенным или метастатическим НМРЛ с мутацией METex14 возможно применение в качестве монотерапии препарата капматиниб до прогрессирования заболевания или развития неприемлемой токсичности. В случае, если назначение капматиниба невозможно, может быть применена терапия кризотинибом [6-7].

### Показания и противопоказания к применению

Показания: набор реагентов рекомендуется применять у пациентов с немелкоклеточным неплоскоклеточным раком лёгкого для сопутствующей диагностики: определения показаний к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы MET. Противопоказания: при применении по назначению специально обученным персоналом противопоказания отсутствуют.

## 1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутации пропуска 14-го экзона в РНК гена *MET* (METex14) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.

Функциональное назначение: вспомогательное средство в диагностике; определение показаний к таргетной терапии с использованием ингибиторов тирозинкиназы MET (капматиниб, кризотиниб), определение мутации METex14 у пациентов с неплоскоклеточным немелкоклеточным раком лёгкого.

Материалом для проведения анализа является РНК, выделенная из опухолевой ткани, фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE). Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: пациенты с неплоскоклеточным немелкоклеточным раком лёгкого.

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 пропуска экзона 14 в гене *MET* методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) "RT-PCR-METex14" по ТУ 20.59.52-024-57201404-2025» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 24 реакции "RT-PCR-METex14 (24)";
- 2) Набор реагентов на 48 реакций "RT-PCR-METex14 (48)".

### 2.2 Комплектность

В комплект поставки входят: набор реагентов (таблица 1), инструкция по применению, паспорт качества.

### 2.3 Состав набора реагентов

Таблица 1. Компоненты набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 24 реакции	на 48 реакций
1	Жёлтый	ПЦР-смесь METex14	475 мкл	950 мкл
2	Синий	Смесь ферментов	25 мкл	50 мкл
3	Красный	ПКО	55 мкл	80 мкл
4	Белый	ОКО	500 мкл	1000 мкл

ПЦР-смесь METex14 – готовая к применению ПЦР-смесь (без ферментов) для обратной транскрипции и амплификации фрагмента гена *MET* с пропуском экзона 14.

Смесь ферментов – высокоочищенный рекомбинантный фермент Taq ДНК-полимераза и обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей (M-MuLV).

ПКО – положительный контрольный образец, содержащий фрагмент РНК METex14 и референсный участок гена *MET*.

ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Набор реагентов не содержит опасных химических веществ, не содержит биологических материалов человеческого и животного происхождения.

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

## 2.4 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 24 реакции "RT-PCR-METex14 (24)" содержит реактивы для проведения 24 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке 20 клинических образцов, ПКО (в трёх повторах) и ОКО или 15 клинических образцов в трёх постановках по 5 клинических образцов с контрольными образцами ПКО и ОКО в каждой постановке.

Набор реагентов на 48 реакций "RT-PCR-METex14 (48)" содержит реактивы для проведения 48 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке 44 клинических образца, ПКО (в трёх повторах) и ОКО или 30 клинических образцов в шести постановках по 5 клинических образцов с контрольными образцами ПКО и ОКО в каждой постановке.

## 2.5 Принцип действия набора

Набор предназначен для выявления пропуска экзона 14 в РНК гена *MET* в образцах РНК из опухолевой ткани, фиксированной формалином и заключенной в парафин (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).

Определяемая мутация гена *MET* согласно номенклатуре HGVS (Human genome variation society): MET NM\_000245.4: c.3284\_3424del.

Процедура состоит из двух этапов.

На первом этапе образцы РНК тестируют в мультиплексной ОТ-ПЦР с помощью олигонуклеотидов, которые селективно амплифицируют участок РНК *MET*, несущий пропуск 14-го экзона. Продукты этой реакции выявляются с помощью TaqMan зонда, меченого флуорофором FAM. Для контроля количества РНК в реакции используется ОТ-ПЦР на референсную последовательность *MET*; продукты этой реакции выявляют TaqMan зондом, меченым флуорофором HEX.

На втором этапе анализируют результаты ОТ-ПЦР. Для этого вначале проверяют значения Ct по каналам HEX и FAM для ПКО, ОКО и клинических образцов. Полученные значения Ct сравнивают с допустимыми значениями, указанными в паспорте качества. Если значения Ct попадают в диапазон допустимых

значений, то результат считают достоверным и переходят к анализу данных на наличие мутации METex14.

Для этого вычисляют значение  $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$  для ПКО и клинических образцов. Для образцов с пропуском 14-го экзона в РНК гена *MET* значение  $\Delta Ct$  меньше, чем для образцов без мутации. Полученные значения  $\Delta Ct$  сравнивают со значением точки отсечения (ТО). Образец считается положительным (содержащим мутацию METex14), если значение  $\Delta Ct$  образца меньше или равно значению ТО. Образец считается отрицательным (без мутации), если значение  $\Delta Ct$  больше значения ТО.

### 3 Аналитические и диагностические характеристики набора

#### 3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% мутации METex14 на фоне РНК гена *MET* без этой мутации. Минимальное количество РНК, необходимое для анализа, составляет 5 мкл с суммарной концентрацией РНК 0.2 нг/мкл.

#### 3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью набора реагентов понимается его способность определять наличие мутации METex14 на фоне избытка РНК гена *MET* без мутации. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов для образцов, содержащих РНК гена *MET* с включением экзона 14.

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

Различное содержание парафина на срезе (от 37% до 76%) не влияет на результаты определения мутации METex14. Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутации METex14.

#### 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. В испытаниях не выявлено расхождений в определении мутации METex14. Значение повторяемости результатов определения мутации METex14 составило 100% (40/40, доверительный интервал 91,19-100% с вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования. В испытаниях не выявлено расхождений в определении мутации METex14. Значение воспроизводимости результатов определения мутации METex14 составило 100% (40/40, доверительный интервал 91,19-100% с вероятностью 95%).

### **3.4 Диагностическая специфичность**

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутации METex14 в клинических испытаниях на выборке из 60 образцов, из них 30 отрицательных образцов, составила 100% (доверительный интервал 88,43-100% с вероятностью 95%).

### **3.5 Диагностическая чувствительность**

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутации METex14 в клинических испытаниях на выборке из 60 образцов, из них 30 положительных образцов, составила 100% (доверительный интервал 88,43-100% с вероятностью 95%).

### **3.6 Ограничения при применении**

Образцы FFPE опухолевой ткани необходимо хранить при температуре 4°C. РНК необходимо хранить при температуре минус 60°C. Все используемые материалы не должны содержать РНКазы. РНК может разрушаться при использовании наконечников, пробирок, перчаток и реагентов, загрязненных РНКазой.

### **3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа**

Референтный метод анализа для определения мутации пропуска экзона 14 в РНК гена *MET* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют.

## **4 Риски, связанные с применением набора реагентов**

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

1. Дегградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инактивация ферментов Taq ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы из-за нарушения условий хранения и

- транспортировки или после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).
2. Недостаточная концентрация РНК из-за несоблюдения рекомендаций по выделению РНК из парафиновых блоков (возможный вред: ложноотрицательный результат).
  3. Некорректная интерпретация результатов ОТ-ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: отсутствие результата, ложноотрицательный результат или ложноположительный результат).
  4. Некорректная интерпретация результатов ОТ-ПЦР из-за использования неверного значения порогового уровня флуоресценции при анализе (возможный вред: ложноотрицательный результат или ложноположительный результат).
  5. Некорректная интерпретация результатов ОТ-ПЦР из-за ошибки при расчёте точки отсечения при анализе (возможный вред: ложноотрицательный результат или ложноположительный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

## 5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска использования набора реагентов – 2б в соответствии с Приказом Минздрава России от 06.06.2012 № 4н.
2. К работе с набором реагентов допускается только персонал, прошедший обучение по правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе II класса биологической безопасности.
5. Перед началом работы рекомендуется очищать рабочее место и оборудование раствором для удаления РНКаз.
6. Во избежание риска деградации образцов РНКазой необходимо использовать наконечники, пробирки и реагенты, не содержащие РНКаз.
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 РНК к ПЦР и обратно.
8. Каждое рабочее место должно быть оснащено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается перемещать их между рабочими станциями.

9. При постановке ОТ-ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
10. Использовать ПЦР-смесь только с ферментами Taq ДНК-полимеразой и обратной транскриптазой, входящими в состав набора реагентов.
11. Не открывать одновременно несколько пробирок с РНК, сразу закрывать пробирку после использования.
12. Минимизировать разговоры и дыхание над открытыми пробирками и образцами.
13. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных партий.
14. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
15. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
16. 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.
17. 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».
18. 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:

«C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (РУ №ФСЗ 2008/01792, «Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

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).

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 ОС Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жесткий диск объемом не менее 10 ГБ, тактовая частота процессора не менее 2,0 ГГц, объем оперативной памяти не менее 1 ГБ, разрешение экрана не менее 1024\*768 и Microsoft Office Excel версии 2003 и выше.

Микроцентрифуга-вортекс, например, встряхиватель лабораторный медицинский "ЦВ-2500" по ТУ 32.50.50-003-27278232-2022 (РУ № РЗН 2023/21055, ООО «НПФ Хеликон», Россия).

Охлаждающий штатив, например, посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований *in vitro*, 17. Штативы изотермические для поддержания заданных температур IsoFreeze для пробирок объемом от 0,2 мл до 2,0 мл (РУ № ФСЗ 2011/10287, «Сайентифик Спешиалтис Инкорпорэйтед (ЭсЭсАй)», США).

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 (от -18°C до -25°C) камерами (например, ATLANT ХМ-6023-031 «ATLANT», Беларусь) и морозильная камера (от -60° С до -80° С).

Центрифуга (при использовании плашек для ПЦР на 96 лунок), 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).

Штатив, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro*. 23. Штатив для пробирок, 80 ячеек (вид 108730). 25. Штатив для пробирок, 96 ячеек (вид 108730). (РУ № ФСЗ 2009/05024, «Корнинг Инкорпорейтед», США).

## 6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

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

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки, зарегистрированный в РФ, например, «Набор реагентов для предобработки биоматериала при выделении нуклеиновых кислот (ПРОБА-ПК) по ТУ 21.20.23-107-46482062-2020» (РУ № РЗН 2021/14384, ООО «ДНК-Технология», Россия) и «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009» (РУ № ФСР 2010/08867, ООО «ДНК-Технология», 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 "Venovy" 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 с крышкой и пробирки в стрипах (или плашки для ПЦР) без РНКаз, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro*: 1. Винтовые крышки с петлей и кольцевой прокладкой для пробирок объемом от 0,5 мл до 2,0 мл. 2. Винтовые крышки с кольцевой прокладкой для пробирок объемом от 0,5 мл до 2,0 мл. 3. Пробирки с винтовой горловиной объемом от 0,5 мл до 2,0 мл. 10. Пробирки объемом 0,1 мл в стрипах по 8 штук, в том числе с крышками. 18. Плашки для ПЦР на 96 лунок. (РУ № ФСЗ 2009/05024 «Корнинг Инкорпорейтед», США).

## 7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ОТ-ПЦР используют клинические образцы РНК, выделенные из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани.

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

Для выделения РНК из срезов FFPE тканей используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов, рекомендуемые наборы: «Набор реагентов для предобработки

биоматериала при выделении нуклеиновых кислот (ПРОБА-ПК) по ТУ 21.20.23-107-46482062-2020» и «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009». Рекомендации по выделению РНК приведены в приложении А.

**ВНИМАНИЕ!** После выделения необходимо хранить образцы РНК при температуре не выше минус 60°C. В процессе выделения РНК и работы с образцами возможно загрязнение РНКазой, что может привести к деградации РНК.

## 8 Проведение анализа

### 8.1 Подготовка реагентов

8.1.1 ПЦР-смесь METex14, ПКО и ОКО быстро разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) и убедиться, что растворы полностью растаяли.

8.1.2 Содержимое пробирок перемешать на вортексе три раза по 3 сек и центрифугировать 3-5 сек при 2000-2500 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.

8.1.3 ПКО разделить на порции по 18 мкл и заморозить при температуре минус 20°C.

8.1.4 Непосредственно перед использованием инкубировать необходимое для эксперимента количество ПКО при температуре 70°C в течение 10 минут.

**ВНИМАНИЕ!** Инкубировать при 70°C только такое количество ПКО, которое необходимо для эксперимента. Остаток ПКО, прогретого при 70°C, в дальнейшем использовать нельзя.

### 8.2 Приготовление смеси для ОТ-ПЦР

8.2.1 Рассчитать количество образцов в постановке ПЦР. Помимо образцов РНК в каждой постановке необходимо анализировать ПКО и ОКО, входящие в состав набора реагентов.

**ВНИМАНИЕ!** В первой постановке ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов новой партии необходимо использовать три повтора ПКО для расчёта точки отсечения (ТО).

При последующих постановках ОТ-ПЦР с набором реагентов этой же партии на этом же амплификаторе разрешается тестировать ПКО без повторов и использовать значение ТО, рассчитанное в первой постановке.

8.2.2 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси METex14 и смеси ферментов с учётом числа образцов РНК, ПКО, ОКО и погрешности при пипетировании:  $X =$

$1,05 * A * N$ , где X – общий объём реагента, A – объём на одну реакцию; N – количество образцов. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведён в таблице 2.

Таблица 2. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь METex14	19 мкл
Смесь ферментов	1 мкл

8.2.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (п. 8.2.2): внести в пробирку рассчитанное количество ПЦР-смеси METex14 (пробирка № 1, жёлтая крышка), достать смесь ферментов (пробирка № 2, синяя крышка) в охлаждающем штативе IsoFreeze (при отсутствии штатива можно держать смесь ферментов на льду), добавить смесь ферментов к ПЦР-смеси METex14 и тщательно перемешать пипетированием. Реакционная смесь готова.

**ВНИМАНИЕ!** Не перемешивать смесь ферментов на вортексе, так как это может привести к инактивации ферментов.

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

**ВНИМАНИЕ!** Во избежание загрязнения оптики амплификатора не маркировать крышки пробирок!

8.2.4 Добавить в пробирки по 20 мкл приготовленной реакционной смеси с ферментами.

8.2.5 Добавить в пробирки с реакционной смесью:

- 5 мкл РНК клинических образцов;
- 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Пример расположения клинических и контрольных образцов с использованием стрипов по восемь пробирок представлен на рисунке 1.

А. Первая постановка ОТ-ПЦР		Б. Последующие постановки ОТ-ПЦР	
А	РНК1	А	РНК1
В	РНК2	В	РНК2
С	РНК3	С	РНК3
Д	РНК4	Д	РНК4
Е	ОКО	Е	РНК5
Ф	ПКО	Ф	РНК6
Г	ПКО	Г	ОКО
Н	ПКО	Н	ПКО

Рисунок 1. Пример расположения клинических и контрольных образцов в стрипе по восемь пробирок. А. Первая постановка ОТ-ПЦР. Б. Последующие постановки ОТ-ПЦР с использованием этой же партии набора реагентов на этом же амплификаторе.

8.2.6 Центрифугировать в течение 3 мин при 2000-2500 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.2.7 Установить стрипы в блок амплификатора.

### 8.3 Программирование и запуск амплификатора

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

8.3.2 Задать объём реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ОТ-ПЦР в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Протокол ОТ-ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	45°C	15 мин	нет
1	95°C	5 мин	нет
10	95°C	15 сек	
	56°C	15 сек	
50	95°C	15 сек	
	56°C	15 сек	да

8.3.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

– HEX – регистрация сигнала при амплификации референсного участка кДНК гена *MET*;

– FAM – регистрация сигнала при амплификации кДНК гена *MET* с мутацией METex14.

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

## 9 Анализ результатов

### 9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

9.1.1 Для оценки достоверности результатов ОТ-ПЦР проанализировать амплификацию контрольных образцов. Для этого открыть окно анализа данных. Для каждого образца определить значение порогового цикла ( $C_t$ ) – цикла амплификации, при котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин  $C_t$  использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговые уровни для каналов HEX и FAM в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Пороговые уровни для каналов FAM и HEX на разных амплификаторах

Амплификатор	FAM	HEX
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот «С1000 Touch» с модулем CFX96	200	200
Амплификатор детектирующий «ДТпрайм»	50	50

9.1.2 Проверить значения  $C_t$  по каналам FAM и HEX для ПКО и ОКО (таблица 5). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа только в том случае, если значения  $C_t$  для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

- для ПКО наблюдается увеличение флуоресценции по каналам FAM и HEX и определяются значения  $C_{tFAM}$  и  $C_{tHEX}$ , которые меньше или равны значениям  $QC_{FAM}$  и  $QC_{HEX}$ , указанным в паспорте качества и на упаковке набора реагента;
- для ОКО значения  $C_{tFAM}$  и  $C_{tHEX}$  не определяются или значения  $C_{tFAM}$  и  $C_{tHEX}$  больше  $C_{tПКО}$  на 6 или более циклов.

Таблица 5. Допустимые значения  $C_t$  для контрольных образцов

Образец	Значение $C_{tHEX}$	Значение $C_{tFAM}$
ОКО	$C_{tHEX}$ не определено или $> C_{tПКО}+6$	$C_{tFAM}$ не определено или $> C_{tПКО}+6$
ПКО	$\leq QC_{HEX}$	$\leq QC_{FAM}$

Если величины  $C_t$  контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если значения  $C_t$  контрольных образцов неоднократно выходят за пределы допустимых значений, необходимо обратиться к производителю. Если значения  $C_t$  контрольных образцов попадают в допустимый диапазон, то можно перейти к анализу клинических образцов.

## 9.2 Анализ результатов ОТ-ПЦР на наличие мутации METex14

*Примечание: в приложении Б приведена пошаговая инструкция по анализу данных с помощью программы «MS Office Excel».*

*Для удобства анализа рекомендуем готовый шаблон, который доступен для скачивания с сайта компании «БИОЛИНК» (<https://biolinklab.ru/>). Инструкция по использованию шаблона приведена в приложении В.*

9.2.1 Используя анализ по пороговому уровню, установить пороговые уровни для каналов FAM и HEX в соответствии с таблицей 4. Проверить графики флуоресценции. Если для некоторых образцов наблюдается плывущий фон флуоресценции (fluorescence drift), то включить коррекцию (fluorescence drift correction). Примеры того, как выглядит плывущий фон флуоресценции, приведены в приложении Г.

9.2.2 Экспортировать данные в программу «MS Office Excel».

9.2.3 Отсортировать данные (сначала столбец «Sample», затем столбец «Well»).

9.2.4 В ячейках, где значение Ct не определено (0), записать число 51 в качестве величины Ct.

9.2.5 Для каждого клинического образца (X) должно наблюдаться увеличение флуоресценции по каналам FAM и HEX и определяться значение Ct ( $Ct_{FAMX}$  и  $Ct_{HEX X}$ ).

9.2.6 Для каждого клинического образца сравнить значение Ct по каналу FAM ( $Ct_{FAMX}$ ) со средним значением  $Ct_{FAM}$  ПКО. Если значение  $Ct_{FAMX}$  больше, чем значение ( $Ct_{FAM}$  ПКО + 4,8) или не определено, то перейти к п. 9.2.7. Если значение  $Ct_{FAMX}$  менее или равно значению ( $Ct_{FAM}$  ПКО + 4,8), перейти к п. 9.2.8 (таблица 6).

Таблица 6. Интерпретация полученных значений  $Ct_{FAMX}$  и  $Ct_{HEX X}$  для клинических образцов

Значение $Ct_{FAM}$	Значение $Ct_{HEX}$	Интерпретация
$Ct_{FAMX} > Ct_{FAM}$ ПКО + 4,8 или не определено	$Ct_{HEX X} \leq Ct_{HEX}$ ПКО + 4,8	Образец пригоден для анализа
	$Ct_{HEX X} > Ct_{HEX}$ ПКО + 4,8 или не определено	Образец непригоден для анализа, повторить анализ, начиная с этапа выделения РНК
$Ct_{FAMX} \leq Ct_{FAM}$ ПКО + 4,8	не задано	Образец пригоден для анализа

9.2.7 Сравнить значение Ct по каналу HEX ( $Ct_{HEX X}$ ) со средним значением  $Ct_{HEX}$  ПКО. Если значение  $Ct_{HEX X}$  менее или равно значению ( $Ct_{HEX}$  ПКО + 4,8), то образец пригоден для анализа. Если значение  $Ct_{HEX X}$  больше, чем значение ( $Ct_{HEX}$  ПКО + 4,8) или не определено, то образец непригоден для анализа. Необходимо повторить анализ, начиная с этапа выделения РНК.

9.2.8 Используя программу «MS Office Excel» рассчитать значение  $\Delta Ct$  для каждого образца и ПКО:  $\Delta Ct = Ct_{\text{FAM}} - Ct_{\text{HEX}}$ .

Для расчёта ТО при первой постановке ОТ-ПЦР с набором реагентов данной партии выполнить пункты 9.2.9-9.2.12.

9.2.9 Используя программу «MS Office Excel», вычислить среднее значение  $\Delta Ct$  ПКО ( $\Delta Ct_{\text{ПКО}}$ ) и стандартное отклонение  $\Delta Ct$  ПКО ( $StO \Delta Ct_{\text{ПКО}}$ ).

9.2.10 Проверить, что  $StO \Delta Ct_{\text{ПКО}}$  меньше либо равно 0,5. Если  $StO \Delta Ct_{\text{ПКО}}$  больше 0,5, то повторить постановку ОТ-ПЦР или обратиться к производителю.

9.2.11 Рассчитать значение точки отсечения (ТО):  $ТО = \Delta Ct_{\text{ПКО}} + 2,0$ .

9.2.12 Для каждого повтора ПКО сравнить значение  $\Delta Ct$  с рассчитанным значением ТО. Для каждого повтора ПКО должно выполняться требование:  $\Delta Ct$  ПКО меньше ТО. Если для какого-то повтора  $\Delta Ct$  ПКО больше либо равно ТО, то нужно проверить расчёты.

Если ТО была определена в предыдущих постановках, то для ПКО должно выполняться требование:  $\Delta Ct$  ПКО меньше либо равно ТО. Если  $\Delta Ct$  ПКО больше ТО, то убедиться, что использована та же партия набора реагентов и тот же амплификатор. Если ошибка не найдена, то обратиться в техническую поддержку производителя.

Если для каждого повтора ПКО требование выполнено, то можно переходить к анализу клинических образцов.

9.2.13 Сравнить значение  $\Delta Ct$  клинического образца ( $\Delta Ct_x$ ) со значением ТО (таблица 7). Если значение  $\Delta Ct_x$  меньше либо равно ТО, то обнаружена мутация METex14 (положительный результат). Если значение  $\Delta Ct_x$  больше ТО, то мутация METex14 не обнаружена (дикий тип или содержание мутации менее предела обнаружения, отрицательный результат).

Таблица 7. Анализ значений  $\Delta Ct$  клинических образцов

$\Delta Ct$ образца	Наличие мутации	Результат
$\Delta Ct \leq TO$	Мутация METex14 обнаружена	Положительный
$\Delta Ct > TO$	Мутация METex14 не обнаружена (дикий тип или содержание мутации менее предела обнаружения)	Отрицательный

## 10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

### 10.1 Условия хранения

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

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

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

### 10.2 Условия транспортирования

10.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от минус 25°C до минус 18°C.

10.2.2 Допускается транспортирование коробки 2 из набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

10.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

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

**ВНИМАНИЕ!** Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БИОЛИНК» (см. раздел 11).

### 10.3 Условия эксплуатации

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

10.3.2 Соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

### 10.4 Условия утилизации

10.4.1 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности и упаковку утилизировать согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21.

10.4.2 В соответствии с классификацией медицинских отходов потребительская упаковка наборов реагентов, неиспользованные реагенты относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым

бытовым отходам). Потребительскую упаковку собирать в одноразовые пакеты любого цвета, кроме жёлтого и красного, с маркировкой на ёмкости для сбора отходов «Отходы. Класс А», утилизировать как производственные или бытовые отходы. Неиспользованные жидкие реагенты содержат только безопасные для человека и среды компоненты, не являются токсичными, поэтому допускается их слив в систему бытовой канализации.

10.4.3 Использованные пробирки от реагентов, плашки, наконечники относятся к классу Б (эпидемиологически опасные отходы). Наконечники, плашки, пробирки, контактировавшие с образцами, собирать в жёлтые пакеты или твердые контейнеры с маркировкой «Отходы. Класс Б» и обязательно обеззараживать перед утилизацией. При удалении отходов после амплификации недопустимо открывание пробирок или плашек с ампликонами и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

## 11 Гарантийные обязательства

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

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

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

## 12 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер 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

## Библиография

1. Molecular Diagnostic Assays and Clinicopathologic Implications of MET Exon 14 Skipping Mutation in Nonesmall-cell Lung Cancer // E. K. Kim, K. A Kim, C. Y. Lee, et al. // Clin Lung Cancer. – 2019. – Vol. 20 (1). – P. e123-e132. – DOI: 10.1016/j.clcc.2018.10.004.
2. MET Exon 14 Skipping Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: An Overview of Biology, Clinical Outcomes, and Testing Considerations // M. A. Socinski, N. A. Pennell, K. D. Davies // JCO Precis Oncol. – 2021. –Vol. 13;5. – P. 653-663. – DOI: 10.1200/PO.20.00516.
3. Current status of molecular diagnostics for lung cancer // E. N. Imyanitov, E. V. Preobrazhenskaya, S. V. Orlov // Explor Target Antitumor Ther. – 2024. – Vol. 5 (3) – P. 742-765. – DOI: 10.37349/etat.2024.00244.
4. Капматиниб у пациентов с MET-положительным распространенным немелкоклеточным раком легкого: анализ российской группы в исследовании Geometry mono-1 // С. В. Орлов, А. А. Мусаелян, Д. Л. Кочесокова и соавт. // Вопросы онкологии. –2022. – Т. 68., № 6. – С. 758-767.– DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-6-758-767.
5. Таргетная терапия MET-позитивного немелкоклеточного рака легкого // Лактионов К. К., Реутова Е.В. // Медицинский совет. – 2023. – Т. 17., №11. – С. 34-39. – DOI: 10.21518/ms2023-194.
6. Немелкоклеточный рак лёгкого. Практические рекомендации RUSSCO, часть 1.1. / Лактионов К. К., Артамонова Е. В., Бредер В. В. и соавт. // Злокачественные опухоли. – 2024. – Т. 14., №3s2. – С. 65-104. – DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-04.
7. Клинические рекомендации. «Злокачественное новообразование бронхов и лёгкого». / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии» // Год утверждения (частота пересмотра): 2025 – 114 с.

## Приложение А (рекомендуемое)

### Рекомендации по выделению РНК из парафиновых блоков

1. Использовать образцы биоматериала с минимальным сроком хранения: рекомендуется использовать FFPE блоки, изготовленные не более двух лет назад, поскольку в старых образцах усиливается химическое сшивание и фрагментация РНК.
2. Использовать несколько тонких срезов: оптимально 4–8 срезов толщиной 10 мкм, избегать слишком толстых срезов, которые затрудняют проникновение реагентов.
3. Контролировать объём элюирования: элюировать РНК в небольшом объеме (100-200 мкл) вместо 300 мкл при использовании рекомендованного набора для выделения РНК, чтобы концентрировать РНК. Также для увеличения выхода РНК можно взять 200 мкл вместо 100 мкл из депарафинированного образца перед дальнейшим протоколом.
4. Избегать многократных циклов замораживания и оттаивания образцов РНК, разделять образцы РНК на аликвоты, чтобы минимизировать их деградацию.

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

### Обработка результатов для термоциклера «C1000 Touch» с модулем «CFX96»

Выбрать режим определения Ct по пороговому уровню (single threshold) и выставить вручную значение порогового уровня для каналов FAM и HEX на 200. Для удобства анализа экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel».

На рисунке Б1 приведён пример обработки данных. В столбце «Target» ввести «METex14» в ячейки, соответствующие ПЦР со смесью METex14 (рисунок Б1, элемент 2). При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новый столбец «Ct<sub>HEX</sub>», где Ct<sub>HEX</sub> – значение Ct образца в мультиплексной ПЦР, определяемое по каналу HEX (рисунок Б1, элемент 5). Значения Ct, определяемые по каналу HEX в мультиплексной ПЦР, скопировать в столбце «Ct» (рисунок Б1, элемент 4) и вставить в столбец «Ct<sub>HEX</sub>» (рисунок Б1, элемент 5), таким образом, чтобы значения Ct и Ct<sub>HEX</sub> для каждой лунки находились в одной строке, соответствующей этой лунке. Добавить столбец «ΔCt». Используя функцию вычитания, для образца ПКО и для каждого клинического образца рассчитать разницу  $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$  (рисунок Б1, элемент 6).

Для расчёта ТО при первой постановке на термоциклере добавить столбцы «ΔCt ПКО» и СтО ΔCt ПКО. Рассчитать ΔCt<sub>ПКО</sub> – среднее значение ΔCt для ПКО, используя функцию «Срзнач», (рисунок Б1, элемент 7) и стандартное отклонение ΔCt ПКО (СтО ΔCt<sub>ПКО</sub>), используя функцию «Стандотклон» (рисунок Б1, элемент 8). Проверить, что СтО ΔCt<sub>ПКО</sub> меньше либо равно 0,5.

Добавить столбец «ТО», и рассчитать значение ТО для данного термоциклера:  $ТО = \Delta Ct_{ПКО} + 2,0$  (рисунок Б1, элемент 9).

Для каждого повтора ПКО сравнить значение ΔCt с рассчитанным значением ТО. Для каждого повтора ПКО должно выполняться требование: ΔCt ПКО меньше ТО. Если для какого-то повтора ΔCt ПКО больше либо равно ТО, то нужно проверить расчёты.

Для последующих постановок на том же термоциклере сравнить полученное значение ΔCt ПКО со значением ТО, рассчитанным в первой постановке. Если значение ΔCt ПКО меньше или равно значению ТО, то можно переходить к анализу результатов ОТ-ПЦР на наличие мутации METex14 в клинических образцах РНК.

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов РНК со значением ТО и записать результат (рисунок Б1, элемент 10).

В примере, приведённом на рисунке Б1,  $\Delta Ct_{\text{ПКО}} = 4,5$ ,  $StO \Delta Ct_{\text{ПКО}} = 0,1$ , что менее 0,5, можно рассчитывать ТО.  $ТО = 4,5 + 2 = 6,5$ .  $\Delta Ct$  ПКО меньше ТО для всех повторов.

Образец РНК1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутации METex14 (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку значение  $\Delta Ct$  составляет 10,8, что больше значения  $ТО = 6,5$ .

Образец РНК2 учитывается как положительный, содержащий мутацию METex14, так как значение  $\Delta Ct$  составляет 3,6, что меньше значения  $ТО = 6,5$ .

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Fluor	Target	Content	Sample	Ct	Ct Mean	Ct Std. Dev	CtHEX	$\Delta Ct$	$\Delta Ct_{\text{ПКО}}$	$StO \Delta Ct_{\text{ПКО}}$	ТО	Результат
FAM	METex14	Neg Ctrl-1	ОКО		0,0	0,0						
FAM	METex14	Pos Ctrl-1	ПКО	22,2	22,1	0,1	17,6	4,5	4,5	0,1	6,5	
FAM	METex14	Pos Ctrl-1	ПКО	22,2	22,1	0,1	17,6	4,5			6,5	
FAM	METex14	Pos Ctrl-1	ПКО	21,9	22,1	0,1	17,6	4,3			6,5	
FAM	METex14	Unkn-1	РНК1	28,9	29,5	0,5	18,1	10,8			6,5	отрицательный
FAM	METex14	Unkn-2	РНК2	21,7	21,8	0,1	18,1	3,6			6,5	положительный
HEX	METex14	Neg Ctrl-1	ОКО		0,0	0,0						
HEX	METex14	Pos Ctrl-1	ПКО	17,6	17,6	0,0						
HEX	METex14	Pos Ctrl-1	ПКО	17,6	17,6	0,0						
HEX	METex14	Pos Ctrl-1	ПКО	17,6	17,6	0,0						
HEX	METex14	Unkn-1	РНК1	18,1	18,0	0,1						
HEX	METex14	Unkn-2	РНК2	18,1	18,0	0,1						

Рисунок Б1. Обработка в программе «MS Office Excel» данных, полученных на термоциклере с модулем «CFX96»

- 1 – в столбце «Fluor» указан канал регистрации флуоресценции (FAM, HEX).
- 2 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с мультиплексной ПЦР-смесью METex14.
- 3 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов РНК, ОКО и ПКО.
- 4 – столбец «Ct», откуда скопированы значения Ct образцов, регистрируемые по каналу HEX (контроль).
- 5 – столбец  $Ct_{\text{HEX}}$ , в который вставлены значения Ct из столбца «Ct».
- 6 – вычисление значений  $\Delta Ct$  по формуле  $\Delta Ct = Ct_{\text{FAM}} - Ct_{\text{HEX}}$ .
- 7 – вычисление  $\Delta Ct_{\text{ПКО}}$  (при первой постановке ОТ-ПЦР для этой партии набора).
- 8 – вычисление стандартного отклонения  $\Delta Ct$  ПКО.
- 9 – рассчитанное значение ТО для термоциклера «CFX96».
- 10 – результат анализа на наличие мутации METex14.

$Ct$  Mean – среднее значение Ct для образца,  $Ct$  Std. Dev – стандартное отклонение значения Ct для образца. Значения  $Ct$  Mean и  $Ct$  Std. Dev не используются при расчётах.

## Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм»

Выбрать режим определения  $C_t$  пороговый метод и выставить ручную значение порогового уровня для каналов FAM и HEX на 50. Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». При необходимости выполнить сортировку и удалить лишние столбцы.

На рисунке Б2 приведён пример обработки данных. Добавить столбец « $\Delta C_t$ ». Используя функцию вычитания, для образца ПКО и для каждого клинического образца рассчитать значение  $\Delta C_t$ :  $\Delta C_t = C_{t\text{FAM}} - C_{t\text{HEX}}$  (рисунок Б2, элемент 4).

Для расчёта  $ТО$  при первой постановке на амплификаторе добавить столбцы « $\Delta C_t$  ПКО» и  $С_{тО} \Delta C_t$  ПКО. Рассчитать  $\Delta C_{t\text{ПКО}}$  – среднее значение  $\Delta C_t$  для ПКО, используя функцию «Срзнач», (рисунок Б2, элемент 5) и стандартное отклонение  $\Delta C_t$  ПКО ( $С_{тО} \Delta C_{t\text{ПКО}}$ ), используя функцию «Стандотклон» (рисунок Б2, элемент 6). Проверить, что  $С_{тО} \Delta C_{t\text{ПКО}}$  меньше либо равно 0,5.

Добавить столбец « $ТО$ », и рассчитать значение  $ТО$  для данного термоциклера:

$$ТО = \Delta C_{t\text{ПКО}} + 2,0 \text{ (рисунок Б1, элемент 7).}$$

Для каждого повтора ПКО сравнить значение  $\Delta C_t$  с рассчитанным значением  $ТО$ . Для каждого повтора ПКО должно выполняться требование:  $\Delta C_t$  ПКО меньше  $ТО$ . Если для какого-то повтора  $\Delta C_t$  ПКО больше либо равно  $ТО$ , то нужно проверить расчёты.

Для последующих постановок на том же амплификаторе сравнить полученное значение  $\Delta C_t$  ПКО со значением  $ТО$ , рассчитанным в первой постановке. Если значение  $\Delta C_t$  ПКО меньше или равно значению  $ТО$ , то можно переходить к анализу результатов ОТ-ПЦР на наличие мутации METex14 в клинических образцах РНК.

Добавить столбец «результат». Сравнить значения  $\Delta C_t$  клинических образцов РНК со значениями  $ТО$  и записать результат (рисунок Б2, элемент 8).

В примере, приведённом на рисунке Б2,  $\Delta C_{t\text{ПКО}} = 4,5$ ,  $С_{тО} \Delta C_{t\text{ПКО}} = 0,1$ , что менее 0,5, можно рассчитывать  $ТО$ .  $ТО = 4,5 + 2 = 6,5$ .

Образец 1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутации METex14 (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку значение  $\Delta C_t$  составляет 9,9, что больше значения  $ТО = 6,5$ . Образцы 2 и 3 учитываются как положительные, содержащие мутацию METex14, так как значения  $\Delta C_t$  составляют 4,2 и 3,9, соответственно, что меньше значения  $ТО = 6,5$ .

1	2	3	4	5	6	7	8
Идентификатор пробирки	Сt, Fam	Сt, Hex	$\Delta$ Сt	$\Delta$ Сt ПКО	СtО $\Delta$ СtПКО	ТO	Результат
Образец_1 (МЕТ)	25,1	15,2	9,9			6,5	отрицательный
Образец_2 (МЕТ)	19,2	15	4,2			6,5	положительный
Образец_3 (МЕТ)	22,2	18,3	3,9			6,5	положительный
ПКО	19,2	14,8	4,4	4,5	0,1	6,5	
ПКО	19,3	14,7	4,6				
ПКО	19,2	14,7	4,5				
ОКО							

Рисунок Б2. Обработка в программе «MS Office Excel» данных, полученных на термоциклере «ДТпрайм»

- 1 – в столбце «Идентификатор пробирки» обозначены номера образцов РНК, ПКО и ОКО.
- 2 – значения Сt образцов по каналу FAM.
- 3 – значения Сt образцов по каналу HEX.
- 4 – вычисление значений  $\Delta$ Сt по формуле  $\Delta$ Сt = Сt<sub>FAM</sub> – Сt<sub>HEX</sub>.
- 5 – вычисление  $\Delta$ Сt<sub>ПКО</sub> (при первой постановке ОТ-ПЦР для этой партии набора).
- 6 – вычисление стандартного отклонения  $\Delta$ Сt ПКО.
- 7 – рассчитанное значение ТO для термоциклера «ДТпрайм».
- 8 – результат анализа на наличие мутации METex14.

## Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных с помощью шаблона в программе «MS Office Excel»

1. Используя анализ по пороговому уровню (single threshold), выставить ручную значения порогового уровня для каналов FAM и HEX на 200 (для термоциклера «С1000 Touch» с модулем «CFX96») или на 50 (для амплификатора «ДТпрайм»).
2. Проверить графики флуоресценции. Если в некоторых лунках наблюдается плывущий фон флуоресценции (fluorescence drift), то включить коррекцию (fluorescence drift correction).
3. Экспортировать данные в программу «MS Office Excel».
4. Отсортировать данные («Sample», потом «Well»).
5. При первой постановке с набором реагентов данной партии использовать вкладку шаблона «Первая постановка», при последующих постановках с набором реагентов этой же партии на этом же амплификаторе – вкладку «Последующие постановки».
6. Скопировать из файла и вставить в шаблон следующие столбцы: «Content», «Sample», «Ct» (выделены серым цветом).
7. Записать значения  $Ct_{FAM}$  и  $Ct_{HEX}$  для ОКО в предназначенные для этого пустые ячейки. Если стандарт ОКО является приемлемым, можно переходить к следующему пункту.
8. Для расчёта ТО при первой постановке ОТ-ПЦР записать значения  $Ct_{FAM}$  и  $Ct_{HEX}$  для трёх повторов ПКО в предназначенные для этого пустые ячейки на вкладке «Первая постановка».
9. Если стандарт ПКО является приемлемым, можно переходить к анализу клинических образцов. Расчёт  $\Delta Ct$ , проверка стандартного отклонения, расчёт ТО будут выполнены автоматически. Столбцы «пригодность образца» и «результат» будут заполнены автоматически.
10. При последующих постановках с этой же партией набора реагентов на этом же амплификаторе не нужно удалять данные для ПКО из первой постановки. Перейти во вкладку «Последующие постановки», записать значения  $Ct_{FAM}$  и  $Ct_{HEX}$  для ОКО и ПКО в предназначенные для этого пустые ячейки. Расчёт  $\Delta Ct$  и проверка приемлемости ОКО и ПКО будут выполнены автоматически. Если стандарты ОКО и ПКО являются приемлемыми, можно переходить к анализу клинических образцов. Столбцы «пригодность образца» и «результат» будут заполнены автоматически.

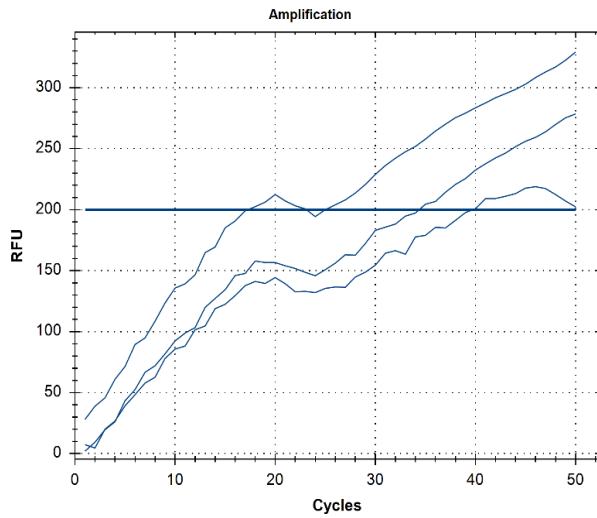
Первая постановка с набором реагентов партии	Content	Sample	Ct	ΔCt	Пригодность образца	Результат
1. Сортировать данные: по образцу, затем по лунке	Pos Ctrl-1	ПКО	22,03	4,8	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
2. Копировать столбцы Content, Sample, Ct	Pos Ctrl-1	ПКО	17,28			
3. Записать Ct FAM ОКО	0 Pos Ctrl-1	ПКО	22,04	4,6	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
4. Записать Ct HEX ОКО	0 Pos Ctrl-1	ПКО	17,40			
Является ли стандарт ОКО приемлемым	приемлемо Pos Ctrl-1	ПКО	22,16	4,5	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
5. Записать Ct FAM первого повтора ПКО	22,03 Pos Ctrl-1	ПКО	17,63			
6. Записать Ct FAM второго повтора ПКО	22,04 Neg Ctrl-1	ОКО		0,0	Концентрация образца недостаточна	Не обнаружена мутация METex14
7. Записать Ct FAM третьего повтора ПКО	22,16 Neg Ctrl-1	ОКО				
8. Записать Ct HEX первого повтора ПКО	17,28 Unkn-1	№1		0,0	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
9. Записать Ct HEX второго повтора ПКО	17,40 Unkn-1	№1	21,31			
10. Записать Ct HEX третьего повтора ПКО	17,63 Unkn-2	№2		0,0	Концентрация образца недостаточна	Не обнаружена мутация METex14
Предел детектирования по Ct FAM	26,88 Unkn-2	№2	22,88			
Предел детектирования по Ct HEX	22,24 Unkn-3	№3	33,05	11,9	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
ΔCt первого повтора ПКО	4,75 Unkn-3	№3	21,14			
ΔCt второго повтора ПКО	4,64 Unkn-4	№4	25,98	3,3	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
ΔCt третьего повтора ПКО	4,53 Unkn-4	№4	22,72			
Стандартное отклонение ΔCt ПКО	0,11 Unkn-5	№5	37,30	15,5	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
Является ли стандарт ПКО приемлемым	приемлемо Unkn-5	№5	21,82			
Точка отсечения	6,6 Unkn-6	№6		0,0	Концентрация образца недостаточна	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-6	№6	24,68			
	Unkn-7	№7	25,83	11,2	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-7	№7	14,63			
	Unkn-8	№8	25,41	11,4	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-8	№8	14,02			
	Unkn-9	№9	25,42	11,0	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-9	№9	14,42			
	Unkn-10	№10	21,8	3,7	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
	Unkn-10	№10	18,1			

Рисунок В1. Пример анализа данных ОТ-ПЦР с использованием шаблона (первая постановка с расчётом ТО)

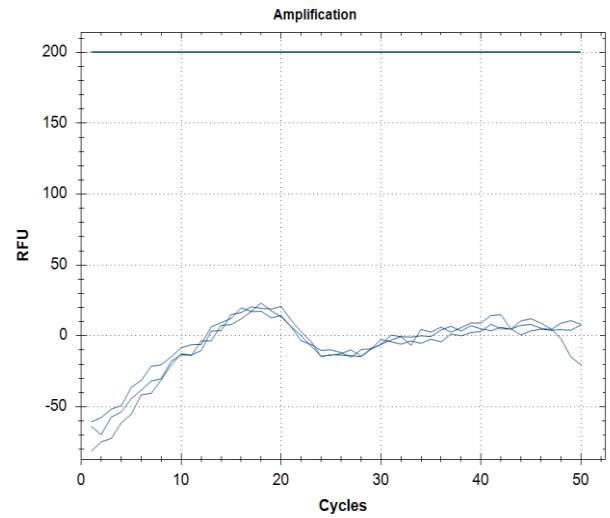
Последующие постановки с набором реагентов той же партии на том же оборудовании	Content	Sample	Ct	ΔCt	Пригодность образца	Результат
1. Сортировать данные: по образцу, затем по лунке	Pos Ctrl-1	ПКО	22,03	4,8	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
2. Копировать столбцы Content, Sample, Ct	Pos Ctrl-1	ПКО	17,28			
3. Записать Ct FAM ОКО	0 Pos Ctrl-1	ПКО	22,04	4,6	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
4. Записать Ct HEX ОКО	0 Pos Ctrl-1	ПКО	17,40			
Является ли стандарт ОКО приемлемым	приемлемо Pos Ctrl-1	ПКО	22,16	4,5	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
5. Записать Ct FAM ПКО	22,03 Pos Ctrl-1	ПКО	17,63			
6. Записать Ct HEX ПКО	17,28 Neg Ctrl-1	ОКО		0,0	Концентрация образца недостаточна	Не обнаружена мутация METex14
Предел детектирования по Ct FAM	26,83 Neg Ctrl-1	ОКО				
Предел детектирования по Ct HEX	22,08 Unkn-1	№1		0,0	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
ΔCt ПКО	4,75 Unkn-1	№1	21,31			
Точка отсечения (рассчитана в первой постановке)	6,6 Unkn-2	№2		0,0	Концентрация образца недостаточна	Не обнаружена мутация METex14
Является ли стандарт ПКО приемлемым	приемлемо Unkn-2	№2	22,88			
	Unkn-3	№3	33,05	11,9	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-3	№3	21,14			
	Unkn-4	№4	25,98	3,3	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
	Unkn-4	№4	22,72			
	Unkn-5	№5	37,30	15,5	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-5	№5	21,82			
	Unkn-6	№6		0,0	Концентрация образца недостаточна	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-6	№6	24,68			
	Unkn-7	№7	25,83	11,2	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-7	№7	14,63			
	Unkn-8	№8	25,41	11,4	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-8	№8	14,02			
	Unkn-9	№9	25,42	11,0	Образец пригоден для анализа	Не обнаружена мутация METex14
	Unkn-9	№9	14,42			
	Unkn-10	№10	21,8	3,7	Образец пригоден для анализа	Мутация METex14 обнаружена
	Unkn-10	№10	18,1			

Рисунок В2. Пример анализа данных ОТ-ПЦР с использованием шаблона (вторая постановка)

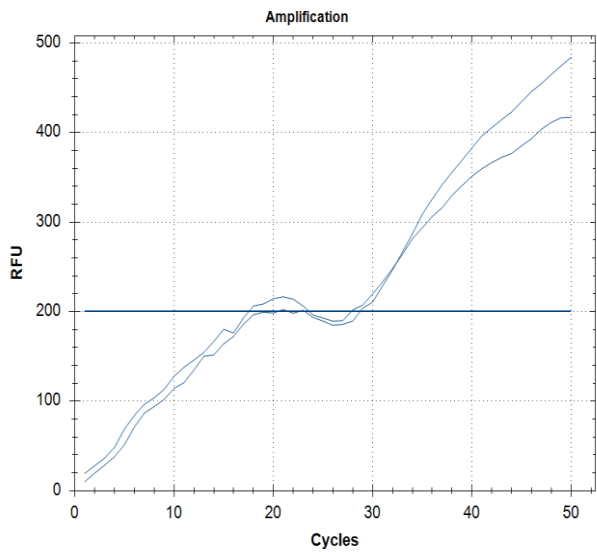
## Приложение Г (рекомендуемое) Примеры плывущего фона флуоресценции



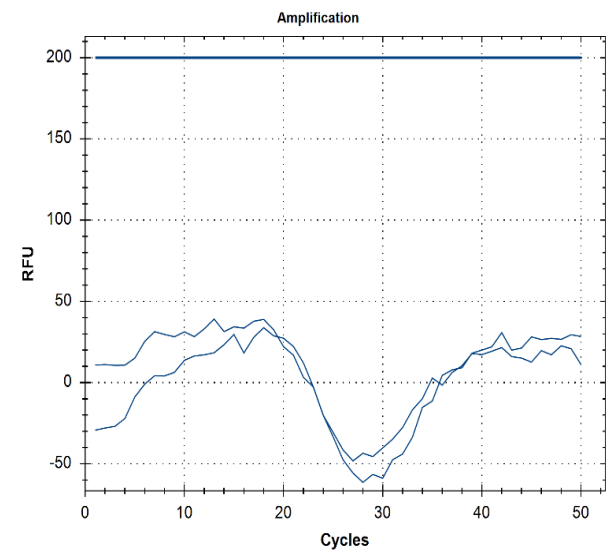
А. До коррекции



Б. После коррекции



В. До коррекции



Г. После коррекции

Рисунок Г1. А, В – графики до коррекции; Б, Г - графики после коррекции

**Производитель: ООО «БиоЛинк»**

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

Телефон: (383) 209-32-40

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

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