

**ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов **C-KIT MutaPrime D816 RQ Kit, 24 теста** для выявления мутации D816V в гене *KIT* в клиническом материале пациентов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Совместимы с амплификаторами: «iQ5» (Bio-Rad); «CFX96» (Bio-Rad); «ABIPrism» (ThermoFisher Scientific); «Lightcycler» (Roche); «Rotor-Gene» 3000/6000 (Corbett Research/Qiagen).

**НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА**

Соматическая мутация D816V в гене *KIT* отмечается у 80% взрослых пациентов с системным мастоцитозом - гетерогенной группе хронических гематологических заболеваний с аномальной пролиферацией тучных клеток в тканях и костном мозге. Помимо этого, мутации в гене *KIT* выявляются у 8% пациентов с ОМЛ, среди которых мутация D816V встречается в 40% случаев, что в свою очередь обуславливает развитие резистентности к иматинибу. *KIT (SCFR; CD117)*, представляет собой онкоген, который кодирует рецептор III типа (рецептор стволовых клеток) с внеклеточным Ig-подобным доменом и внутриклеточной активностью тирозинкиназы. При этом мутация D816V ассоциирована с конститутивной активацией рецептора, что означает, что миграция, выживание и активация тучных клеток больше не могут контролироваться фактором стволовых клеток.

**Набор предназначен для использования исключительно в исследовательских целях.**

**СОСТАВ НАБОРА**

Комплект реагентов «C-KIT MutaPrime D816 RQ Kit, 24 теста» включает:

Реактив		Описание	Объем (мкл)	Кол-во	
ДНК-калибраторы	KITmut/ KITcontrol	C1 KITmut/ KITcontrol	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
		C2 KITmut/ KITcontrol	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
		C3 KITmut/ KITcontrol	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
		C4 KITmut/ KITcontrol	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
		C5 KITmut/ KITcontrol	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
Олигонуклеотиды	KIT	PrimerMix_mut	Прозрачная окрашенная жидкость	75	1 пробирка
		PrimerMix_control	Прозрачная окрашенная жидкость	75	1 пробирка
ПЦР Мастер-микс		PCR Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	710	2 пробирки
Вода стерильная деионизированная		Water	Прозрачная бесцветная жидкость	1270	1 пробирка

ДНК-калибраторы (C1, C2, C3, C4, C5) – представляют собой количественно охарактеризованные препараты плазмидной ДНК, содержащие вставки участка ДНК *KIT* D816V и контрольного участка ДНК *KIT*. Используются для построения калибровочной кривой ПЦР для *KIT* D816V и контрольного участка *KIT*, а также в качестве положительных контролей ПЦР.

Результаты амплификации ДНК *KIT* D816V и контрольного участка *KIT* регистрируются по каналу флуоресценции Green/FAM.

**ВЫПОЛНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

При получении набора распределите реактивы на хранение в соответствии с температурным режимом:

- Олигонуклеотиды (PrimerMix\_mut, PrimerMix\_control) и реакционную смесь (PCRMix) необходимо хранить при температуре -20°C.
- ДНК-калибраторы (C1...C5) необходимо хранить при температуре +4°C (срок хранения - 4 месяца).

В случае длительного хранения всего набора рекомендована температура от -40 до -20°C. ДНК-калибраторы (C1...C5) размораживаются однократно, после чего могут быть использованы в течение 2 месяцев.

- Перед началом работы разморозьте PrimerMix\_mut, PrimerMix\_control и PCRMix при комнатной температуре (в течение 15-30 мин). Перед применением реактивов убедитесь, что кристаллы льда полностью растаяли;
- Тщательно перемешайте все компоненты реакции, осадите капли с помощью настольной центрифуги - 10 сек при 1000 g (quick spin);
- Внесите приготовленную ПЦР-смесь в микропробирку для ПЦР объемом 0,2 мл. Расход реагентов на реакцию:

Таблица 1. Расход реагентов на одну ПЦР-реакцию

Компонент набора	ПЦР-смесь, объем (мкл)		
	Из расчета на 1 реакцию	Из расчета на 52 реакции (10 проб пациентов)	Из расчета на 52 реакции (10 проб пациентов с учетом возможной погрешности дозатора)
PrimerMix_mut ИЛИ PrimerMix_control	1	52	55
PCR Mix	10	520	550
H <sub>2</sub> O	9 (до 20 мкл)	468	495

**NB!** Для каждого пациента необходимо ставить реакции с PrimerMix\_mut и PrimerMix\_control в двух повторях. В каждую серию исследований рекомендуется ставить дополнительные контрольные пробирки без добавления ДНК-матрицы (NTC-контроли).

- Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавьте по 5 мкл образца ДНК в пробирку с реакционной смесью, содержащей PrimerMix\_mut, затем в пробирку с реакционной смесью, содержащей PrimerMix\_control;
- Для каждого вида замеса (содержащего PrimerMix\_mut или PrimerMix\_control) необходимо поставить по 5 контрольных образцов-калибраторов. Для этого в 5 микропробирок с ПЦР-смесью каждого вида внесите по 5 мкл ДНК-калибратора (C1, C2, C3, C4, C5);
- Поместите микропробирки в амплификатор;

- Запросите рампирующую программу для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (общий объем реакции составляет 25 мкл):

Таблица 2. Программа амплификации для термоциклеров «iQ iCycler» (Bio-Rad), «CFX96» (Bio-Rad) и «Quantstudio» (Applied Biosystems)

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во повторов
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	15 с	-	50
	60	60 с	FAM	

Таблица 3. Программа амплификации для «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Повторов
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	10 с	-	47
	60	50 с	Green	

**АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией к прибору.

В пробирках с PrimerMix\_mut регистрируется накопление продуктов амплификации участка ДНК гена *KIT*, содержащего мутацию D816V, в пробирках с PrimerMix\_control – контрольного участка ДНК гена *KIT*.

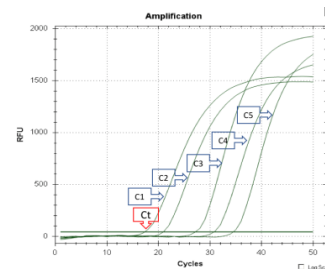


Рисунок 3. Накопление продукта амплификации

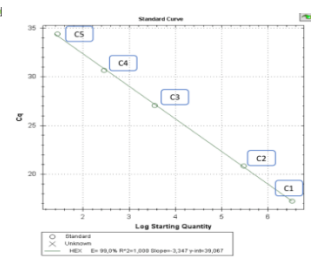


Рисунок 4. Пример калибровочной кривой ДНК-калибраторов

На основании значений порогового цикла «Ct» (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений калибраторов (см. вкладыш к набору) происходит автоматическое построение калибровочных кривых и расчет значений копийности *KIT* D816V и контрольного участка *KIT* в образце (см. руководство к соответствующему термоциклеру для ПЦР в реальном времени).

Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации копий *KIT* D816V в исследуемых и контрольных образцах по следующей схеме:

- Рассчитать отношение для всех образцов: Число копий ДНК *KIT* D816V/ число копий контрольного участка ДНК *KIT*.
- Рассчитать среднее значение отношения концентраций *KIT* D816V/ контрольный участок *KIT* для двух повторов образца, умножить полученный результат на 100.

**КРИТЕРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА**

Критерий	Допустимые значения/результаты
Отклонение Ct между повторами	≤ 2 (при среднем значении Ct >36) ≤ 1,5 (при среднем значении Ct ≤36)
Угловой коэффициент стандартной кривой (Slope)	между -3,0 и -3,9 (при эффективности ПЦР 100% Slope= -3,32)
Коэффициент детерминации (R <sup>2</sup> ) для стандартной кривой	> 0.98
Минимальное стандартное разведение C5 или C4 (для контрольного участка <i>KIT</i> )	Должно детектироваться и включаться в стандартную кривую
Отрицательные контроли без добавления матрицы (NTC) для <i>KIT</i> D816V и контрольного участка <i>KIT</i>	Не должны детектироваться

**ВАЖНО!** Результаты не подлежат учету если:

- Отличие отношений концентрации *KIT* D816V/ контрольный участок *KIT* для двух повторов одного образца более чем четырехкратное. Т.е. (повтор-1 *KIT* D816V/ контрольный участок *KIT*) / (повтор-2 *KIT* D816V/ контрольный участок *KIT*) > 4 или < 0,25\*  
\*За исключением образцов, для которых измеренное число копий *KIT* D816V менее 25.
- Коэффициент детерминации R<sup>2</sup> при построении калибровочной кривой менее 0,95; требуется перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа.
- Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

**принцип метода:**

Метод определения содержания *KIT* D816V в клиническом материале основан на амплификации с детекцией в режиме «реального времени» с помощью технологии TaqMan, в основе которой лежит гидролиз зондов за счет 5'-3' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы). Согласно данной технологии матрицу добавляют в смесь ПЦР, содержащую стандартные компоненты и зонд, способный гибридизоваться с матрицей между двумя праймерами. Зонд мечен флуорофором (FAM или HEX) на 5'-конце и поглощающим гасителем BHQ (Black Hole Quencher) на 3'-конце. До тех пор, пока зонд интактен, эмиссия одного красителя гасится вторым за счет резонансного переноса энергии. В ходе ПЦР ДНК-полимераза, дойдя до локуса, с которым связан TaqMan-зонд, разрушает последний за счет присущей ей 5'-3' экзонуклеазной активности. В результате чего происходит разобщение красителя и гасителя на концах зонда и прекращение действия эффекта резонансного переноса энергии. После этого флуоресценция красителя может быть зафиксирована при помощи детектора. ПЦР осуществляется в ПЦР-миксах с двумя видами олигонуклеотидов: амплификация участка ДНК *KIT* D816V и фрагмента ДНК контрольного участка *KIT* в качестве эндогенного внутреннего контроля и гена-нормализатора.

**Отбор и хранение образцов**

Образец крови или костного мозга с ЭДТА. Материал помещают в пробирку типа Vacutainer (BD) с 6% раствором ЭДТА. Закрытую пробирку несколько раз переворачивают.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

Оборудование:

1. Real-Time амплификатор («iQ5» (Bio-Rad); «CFX96» (Bio-Rad); «ABIPrism» (ThermoFisher Scientific); «Lightcycler» (Roche); «Rotor-Gene» 3000/6000 (Corbett Research/Qiagen).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С;
3. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
4. Холодильник от + 2 до + 8 °С, морозильная камера не выше - 16 °С для реагентов и выделенных ДНК;

Варианты наборов реагентов для выделения ДНК:

- Набор реагентов для выделения ДНК из биологических образцов Column DNA Kit на 100 выделений (кат. номер IG-CDK-100, Inogene, Россия).

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ: ООО «Иноген»**



197376 Санкт-Петербург, наб. реки Карповки д.5  
тел. (812) 921-70-15  
www.inogene.ru  
email: info@ino-gene.com