

Принцип действия наборов базируется на технологии на основе разрушаемых олигонуклеотидных зондов с химическими модификациями, позволяющими добиться высокой чувствительности и специфичности. В зависимости от общего количества ДНК в образце определяется до 1-5% мутантной ДНК на фоне геномной ДНК дикого типа с точностью не менее 99,9%. Характеристики наборов позволяют воспроизводимо выявлять мутации, присутствующие в образце в низкой концентрации, сводя к минимуму вероятность ложноотрицательных результатов.

Наборы совместимы со всеми распространенными реал-тайм амплификаторами: ABI 7300/7500/StepOne, Bio-Rad iQ5/CFX, Rotor-Gene 3000/6000, ДТ-96 и т.д.

Основные характеристики:

- Широкий диапазон рабочих концентраций ДНК (от 0.5 до 50 нг/мкл).
- Выполнение анализа за одну постановку ПЦР, время реакции на современных приборах менее одного часа
- Проведение реакции в одной пробирке (на каждую мутацию)
- Наличие внутреннего контроля реакции по каналу HEX
- Высокая аналитическая чувствительность (50 копий мутантной ДНК)
- Простая интерпретация результата

На примере графиков для мутации V600K гена BRAF мы продемонстрируем особенности, на которые необходимо обратить внимание при интерпретации результатов анализа. Приведенные данные справедливы для всех тканевых наборов производства ООО “Тестген” (EGFR, KRAS, NRAS и др.).

Применяемая технология отличается от широко распространенной аллель-специфичной ПЦР тем, что аналитическим сигналом относительной концентрации мутантной ДНК в пробе является не пороговый цикл реакции по каналу FAM, а интенсивность флуоресценции, что дает возможность использовать простой алгоритм интерпретации по наличию или отсутствию кривой ПЦР и избавиться от вычислений дельты Ct и необходимости ставить предварительную ПЦР для определения рабочей концентрации ДНК. При этом об общей концентрации ДНК или ингибировании ПЦР судят по пороговому циклу канала HEX (внутренний контроль).

Примеры анализа серии проб с различными концентрациями мутантной ДНК на приборе Bio-Rad CFX приведены на рисунках 1-3.

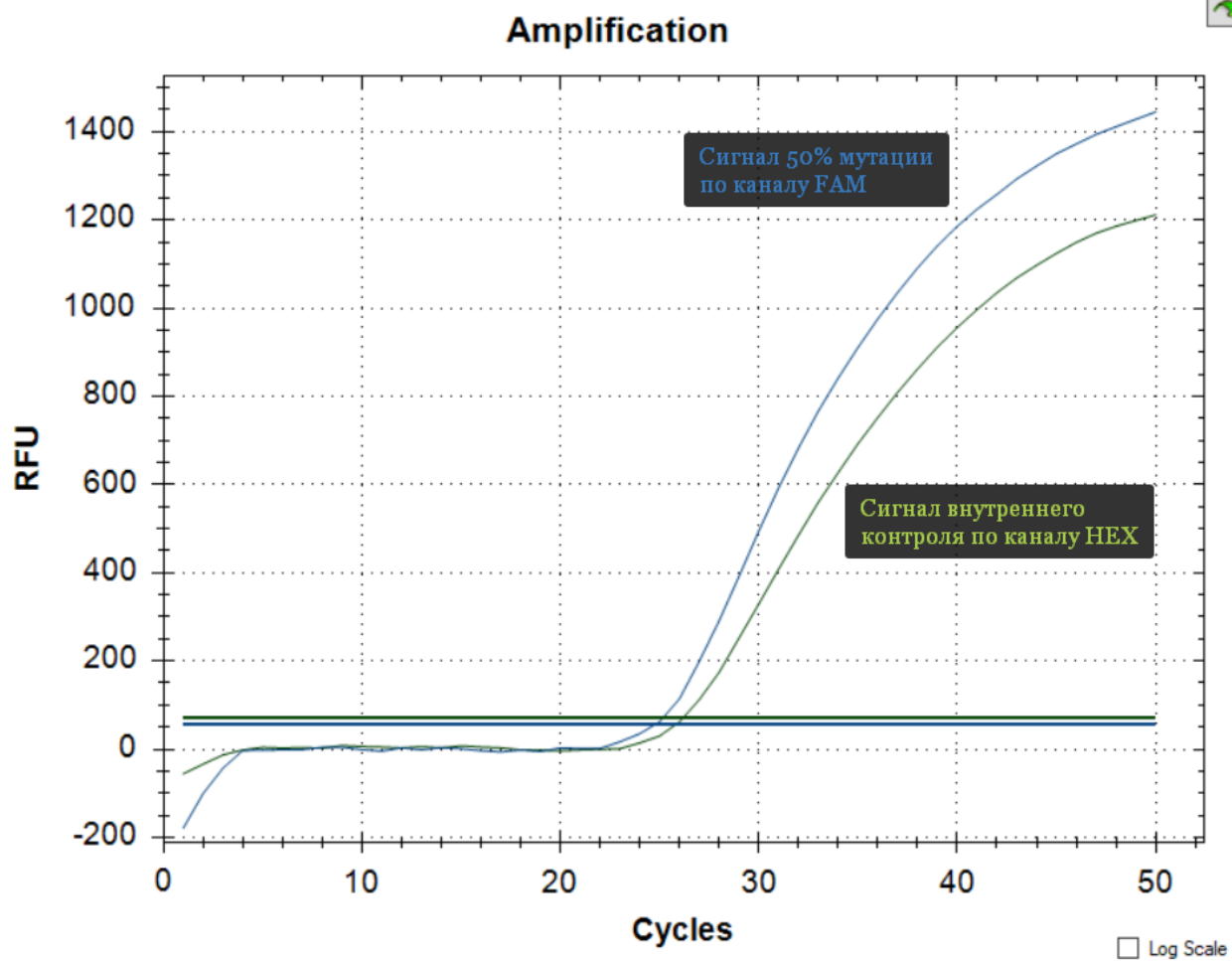


Рис. 1. Кривые флуоресценции для пробы с содержанием мутации 50% и общей концентрацией ДНК 12 нг/реакцию (2 нг/мкл).

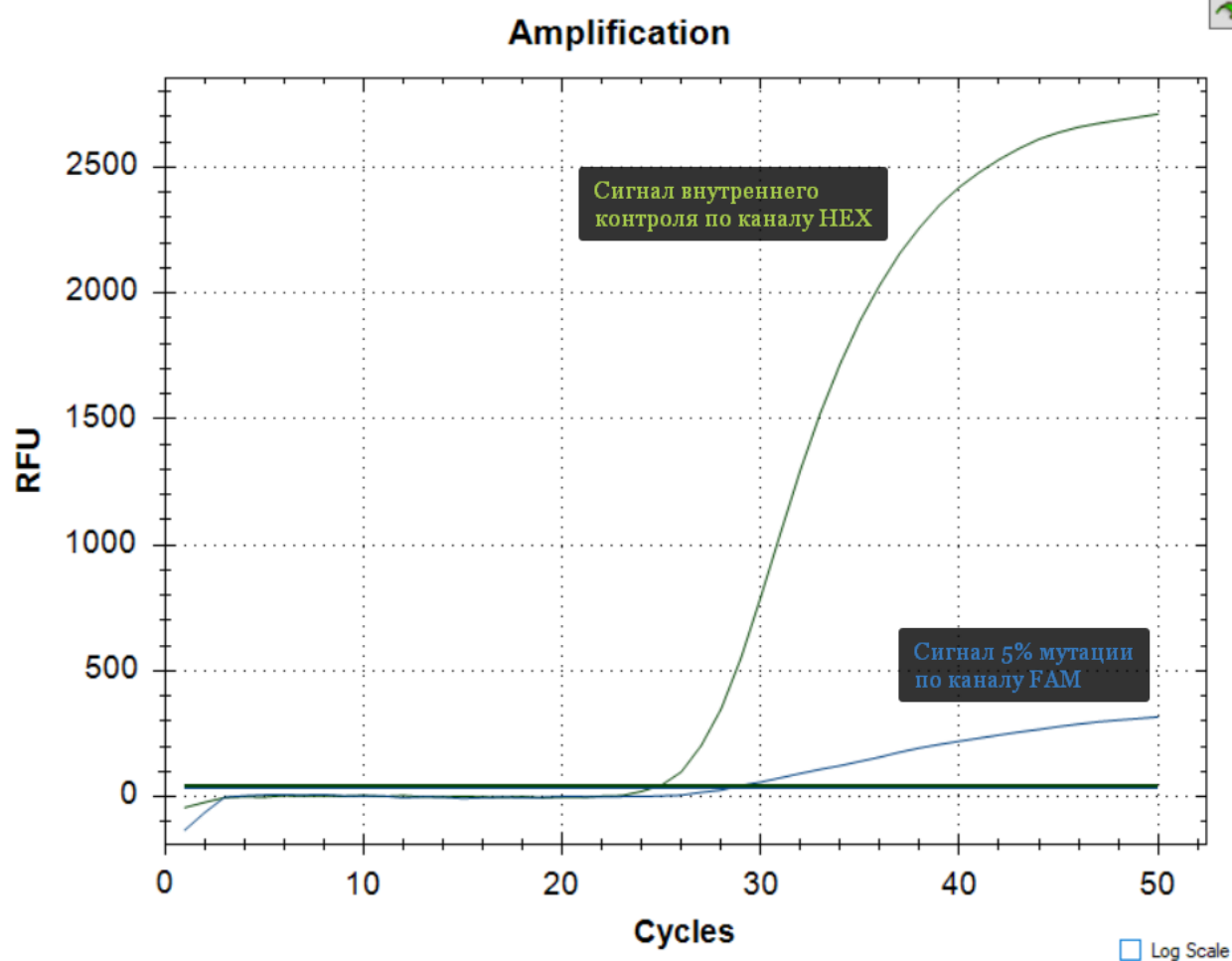


Рис. 2. Кривые флуоресценции для пробы с содержанием мутации 5% и общей концентрацией ДНК 12 нг/реакцию (2 нг/мкл).

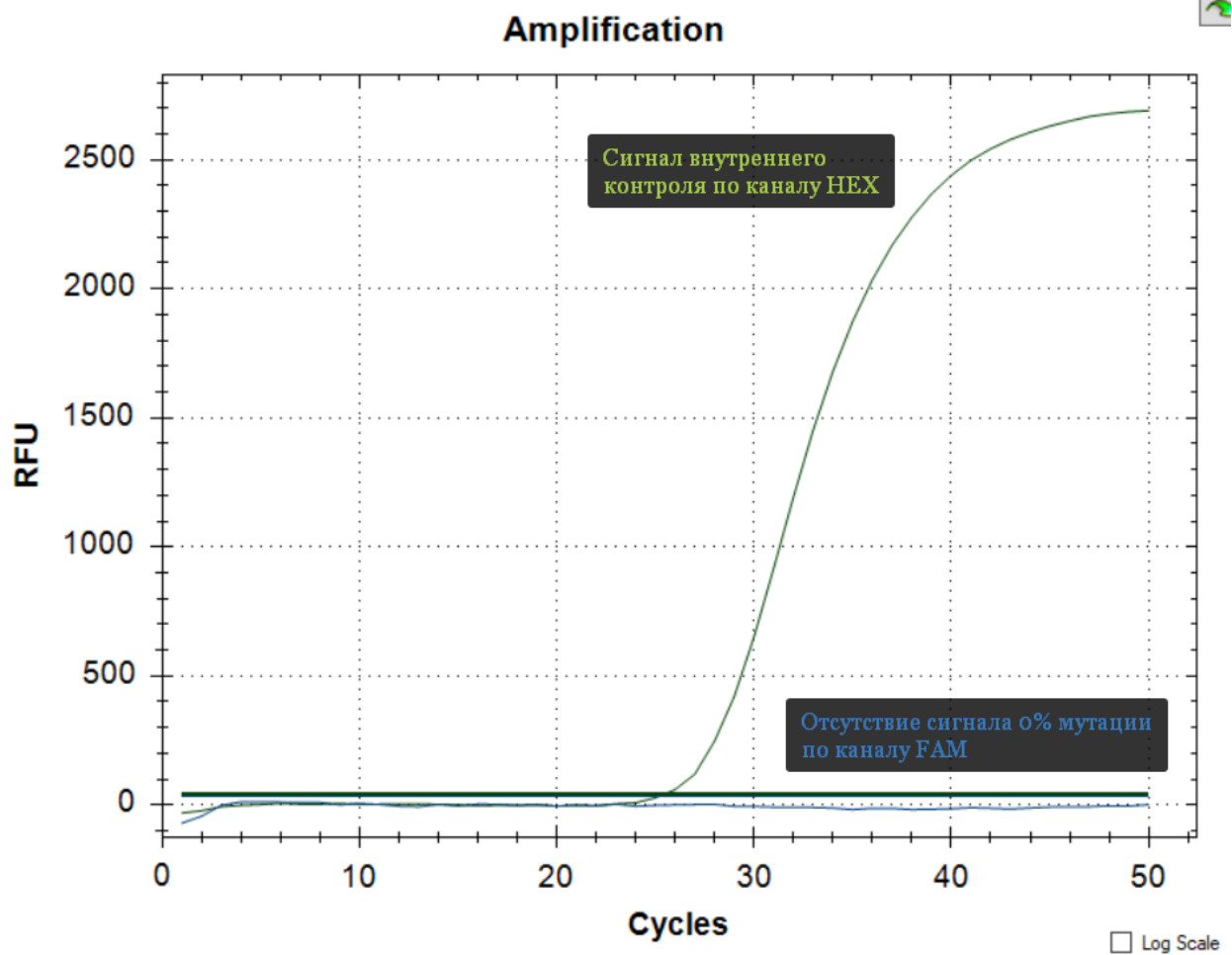


Рис. 3. Кривые флуоресценции для пробы без мутации с концентрацией ДНК 12 нг/реакцию (2 нг/мкл).

Примеры анализа серии проб с различными концентрациями ДНК дикого типа (без наличия мутаций) на приборе Bio-Rad CFX приведены на рисунках 4-5.

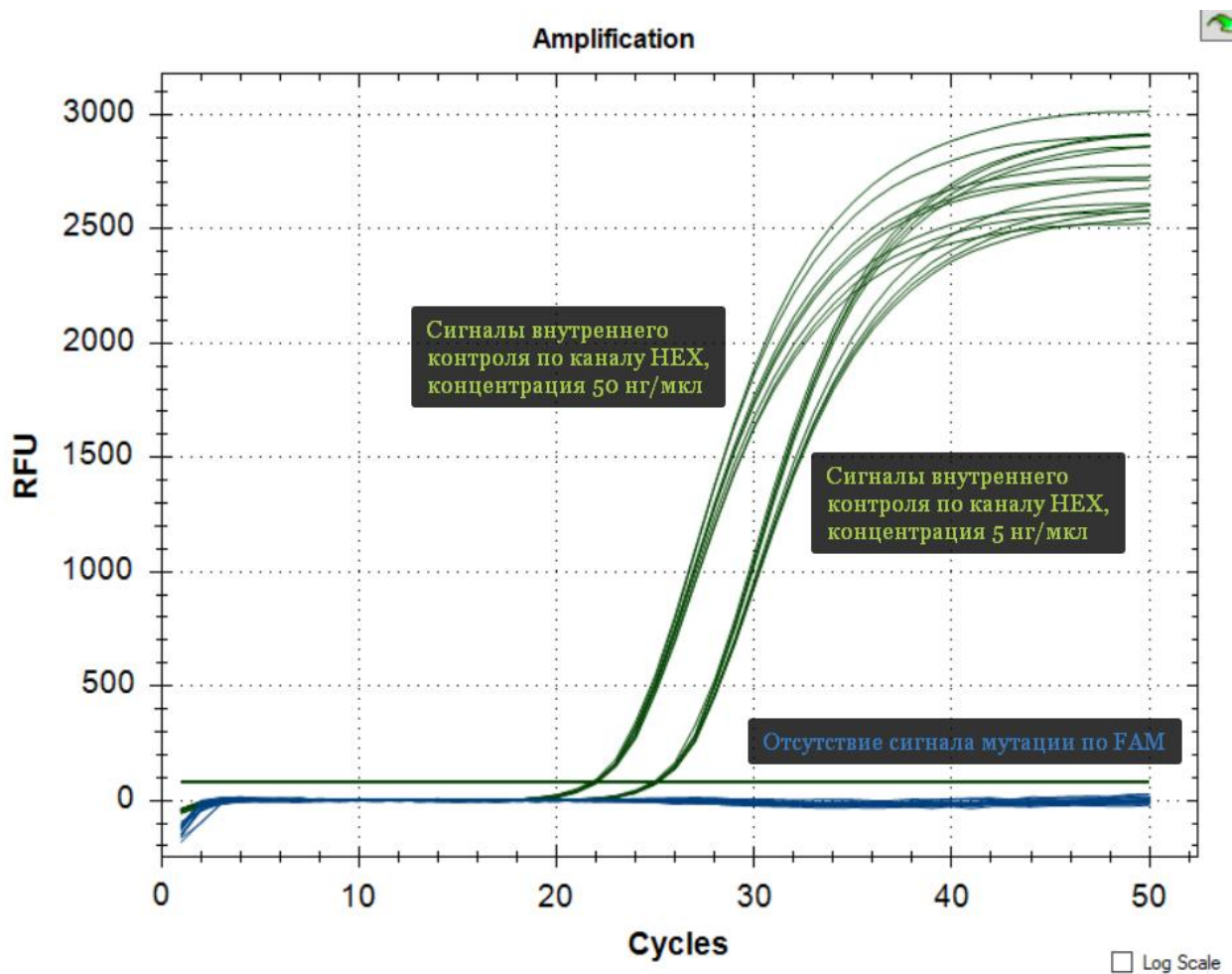


Рис. 4. Кривые флуоресценции для проб без мутации с концентрацией ДНК 300 нг/реакцию (50 нг/мкл) и 30 нг/реакцию (5 нг/мкл).

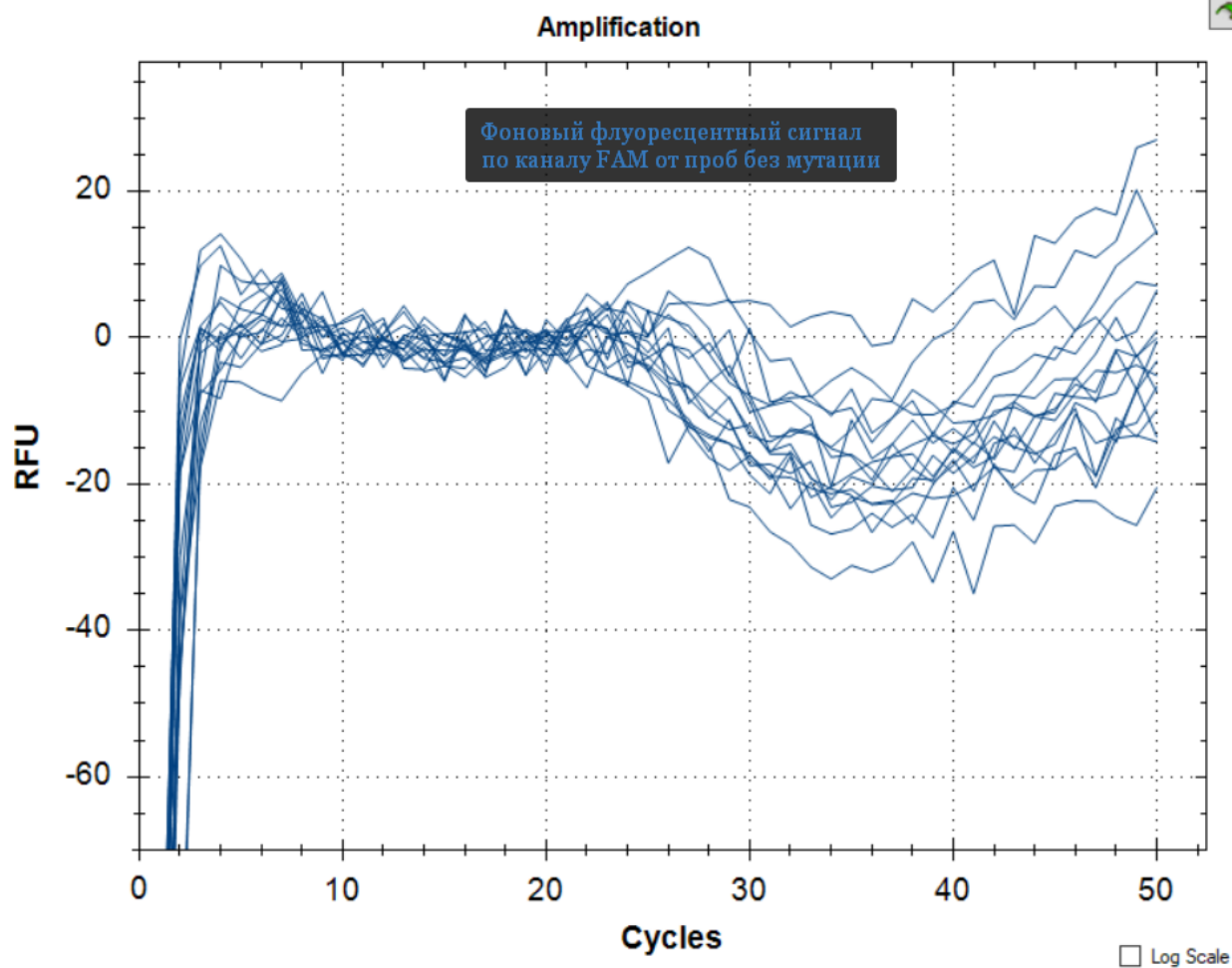


Рис. 5. Сигнал флуоресценции по каналу FAM для проб без мутации с концентрацией ДНК 300 нг/реакцию (50 нг/мкл) и 30 нг/реакцию (5 нг/мкл) – для наглядности отключено отображение канала HEX и увеличена часть графика. Разброс значений по каналу FAM для холостых проб даже с высокой концентрацией ДНК дикого типа составляет от -20 до 20 RFU.

Примеры анализа серии проб с низкими концентрациями мутантной ДНК на приборе Bio-Rad CFX приведены на рисунках 6-7.

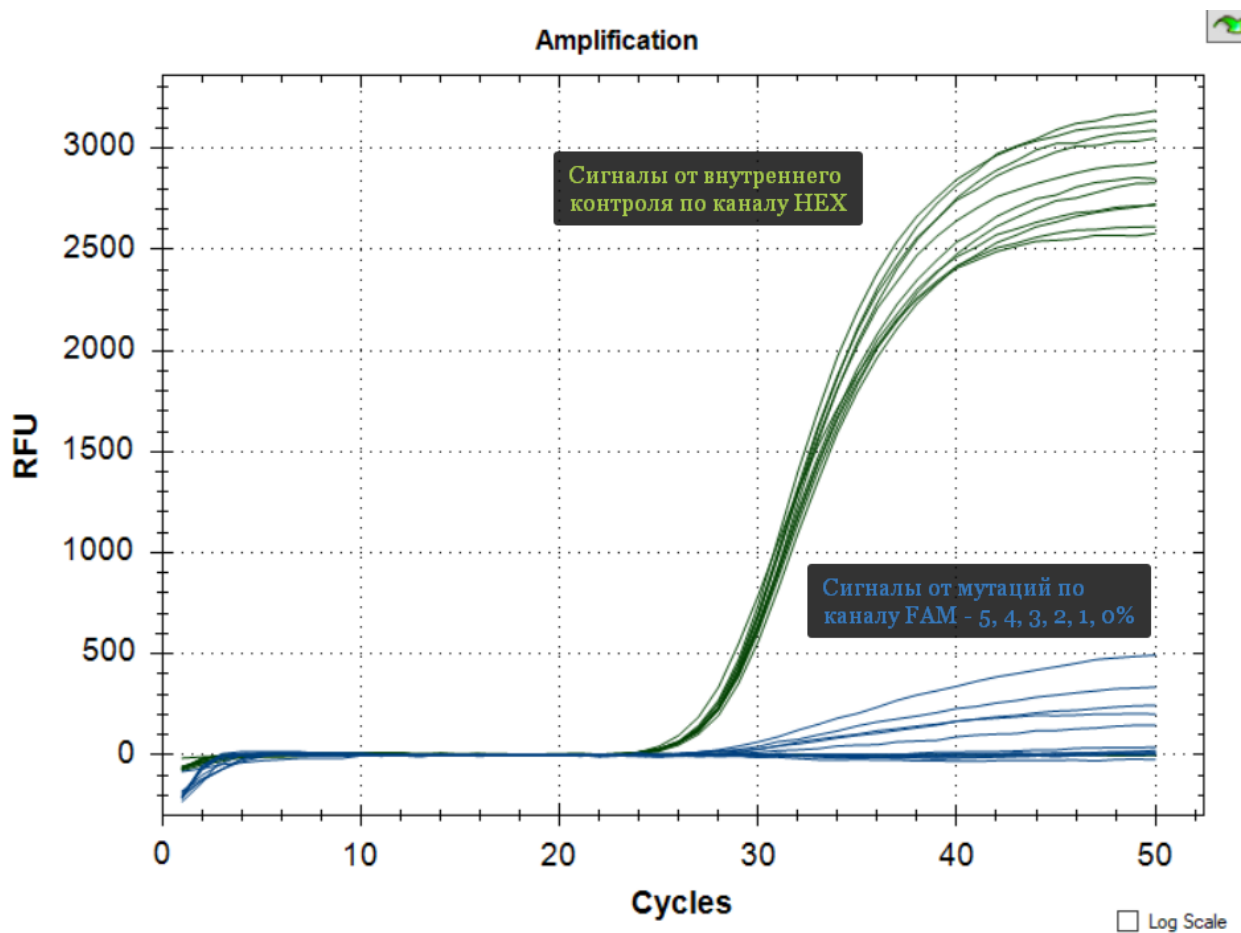


Рис. 6. Кривые флуоресценции для пробы с содержанием мутации 5, 4, 3, 2, 1% и общей концентрацией ДНК 12 нг/реакцию (2 нг/мкл).

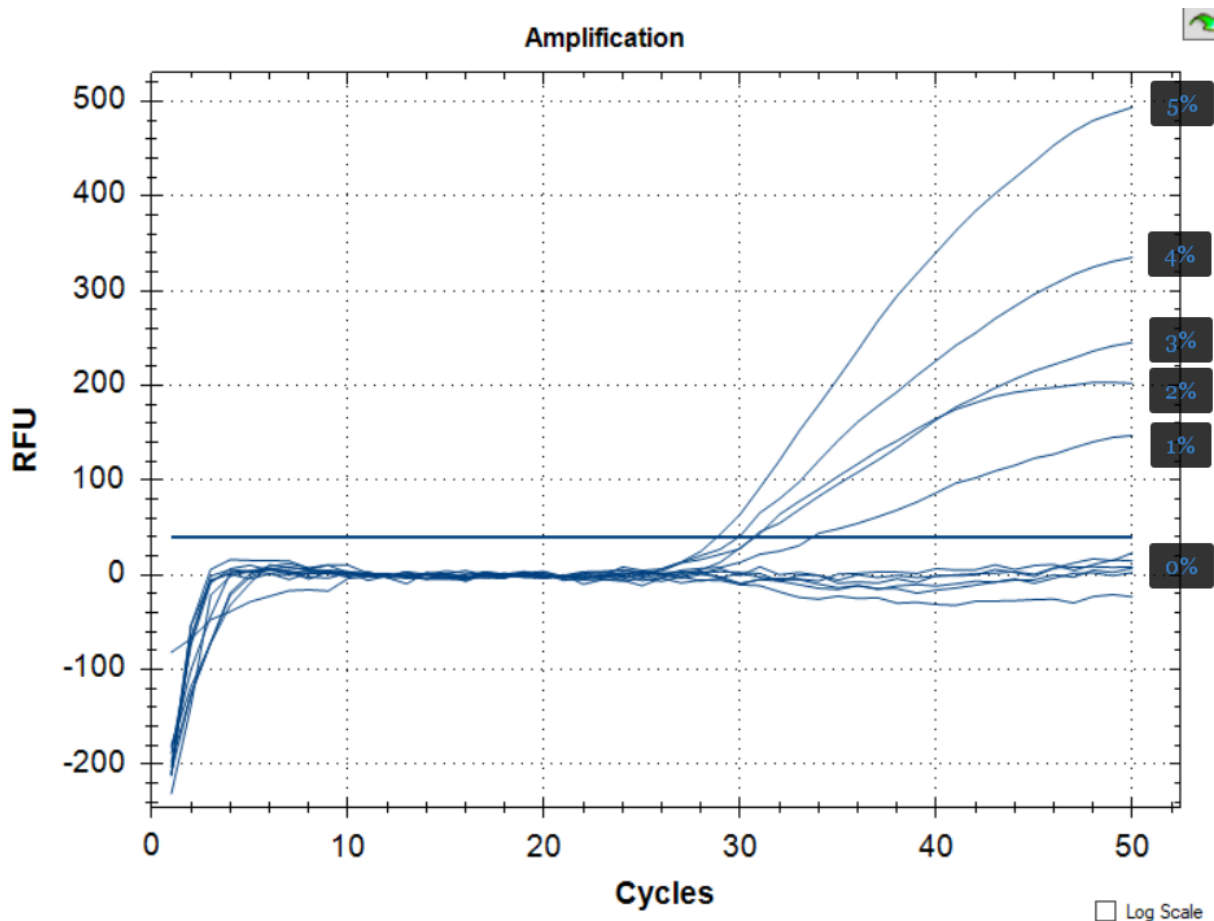


Рис. 7. Кривые флуоресценции для пробы с содержанием мутации 5, 4, 3, 2, 1, 0% и общей концентрацией ДНК 12 нг/реакцию (2 нг/мкл) – для наглядности отключено отображение канала HEX и увеличена часть графика. Разброс значений по каналу FAM для холостых проб составляет от -20 до 20 RFU, в то время как полезный сигнал от пробы с концентрацией мутации 1% составляет более 150 RFU. Относительный предел обнаружения с доверительной вероятностью 0.99 равен 0.6%.

Для определения общей концентрации ДНК в пробе или наличия ингибирования используют пороговый цикл канала HEX. В случае ингибирования (нестабильное прохождение внутреннего контроля в разных мутациях, отсутствие ПЦР при заведомо достаточной концентрации ДНК, слабый подъем кривых и т.д.) рекомендуется развести пробу в 10 раз и повторить анализ.

Примеры анализа серии проб с различными концентрациями ДНК дикого типа (без мутаций) на приборе Bio-Rad CFX приведены на рисунке 8.

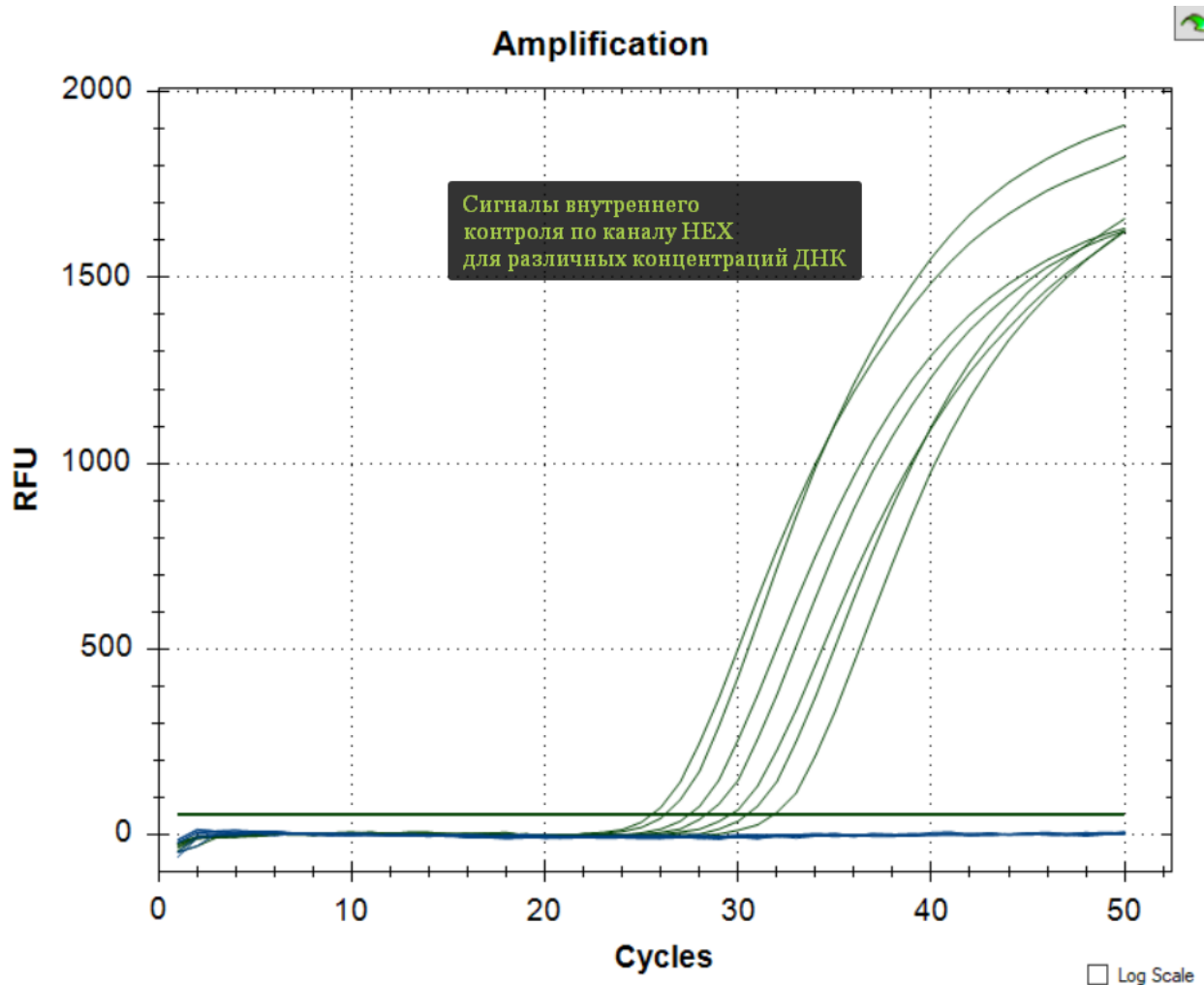


Рис. 8. Кривые флуоресценции для проб без мутации с концентрацией ДНК 25, 12, 6, 3, 1.5, 1, 0.5 нг/мкл. Концентрации 0.5 нг/мкл (~150 копий/мкл, ~900 копий/реакцию) соответствует $C_t \approx 32-33$ цикла, это является минимальной рекомендуемой концентрацией для проведения анализа. Оптимальная концентрация 2-6 нг/мкл. Минимально допустимая концентрация лежит в диапазоне $C_t \approx 34-35$ циклов, но следует помнить, что при низкой концентрации падает чувствительность тест-системы и повышается вероятность ложноотрицательных результатов (можно пропустить мутации с концентрацией 5-10%).

Типичные ситуации с сомнительным результатом анализа.

В ряде случаев возможен неспецифический подъем кривой флуоресценции по каналу FAM при отсутствии в ДНК образца искомой мутации, причины этого могут быть следующие:

1. Загрязнение ножа предыдущим образцом, чувствительности наборов хватает, чтобы определить следовые количества мутаций из материала предшествующего блока, если нож недостаточно тщательно очищается между подрезками.
2. Некорректный температурный профиль конкретного прибора или неправильная температура реакции в пробирке (например, из-за краевого эффекта термоблока у некоторых моделей амплификаторов).
3. Слабая контаминация мутантной ДНК.
4. Неверная установка высоты пороговой линии прибором или вручную (рекомендуется использовать портал pcr24.ru для автоматического определения параметров анализа).

Примеры неспецифических подъемов кривых ПЦР приведены на рисунках 9-10.

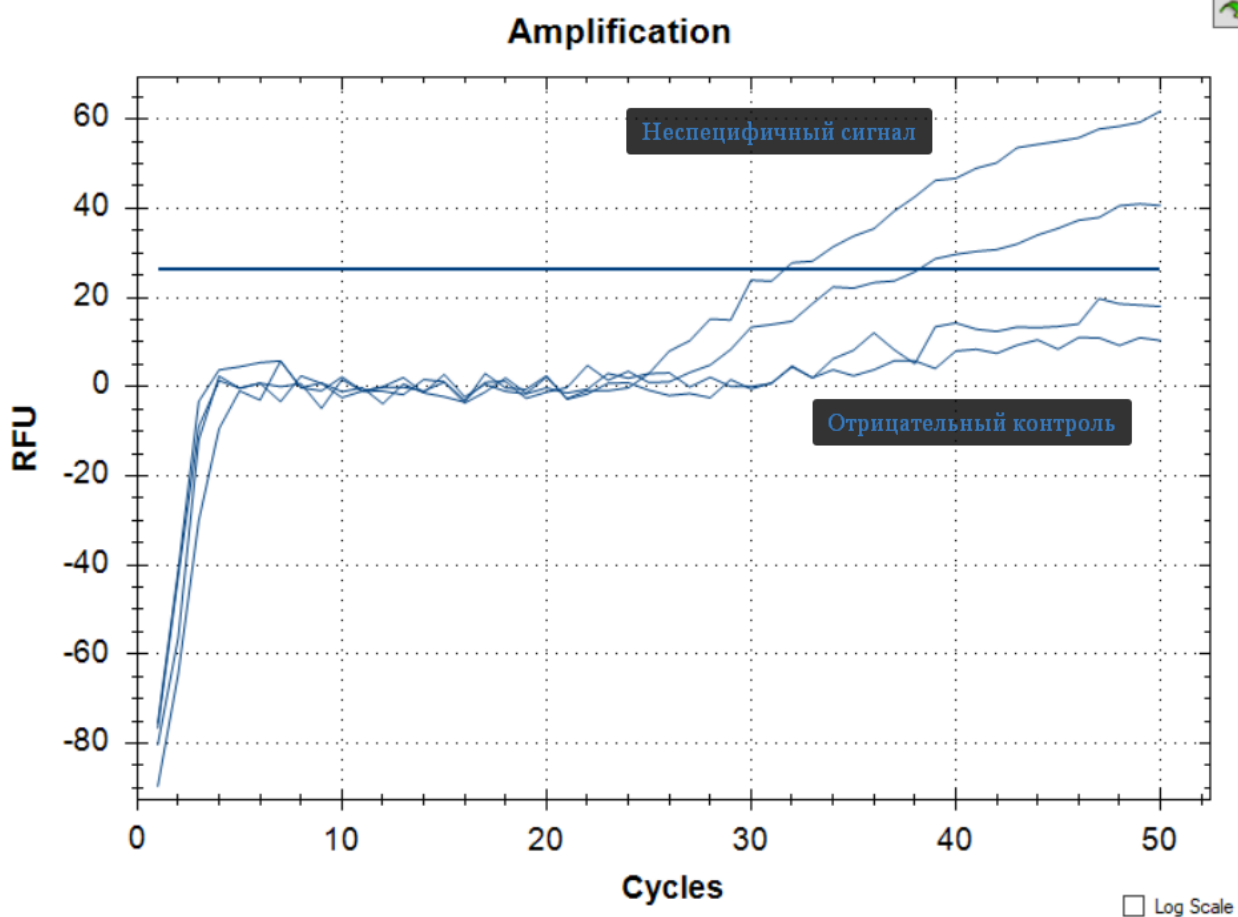


Рис. 9. Кривые флуоресценции для проб без мутации, загрязненных материалом предыдущего среза, и отрицательный контроль – для наглядности отключено отображение канала HEX и увеличена часть графика. Причиной ложноположительного результата является выставление слишком низкого порога, общая картина по сравнению с ПКО 5% представлена на следующем рисунке.

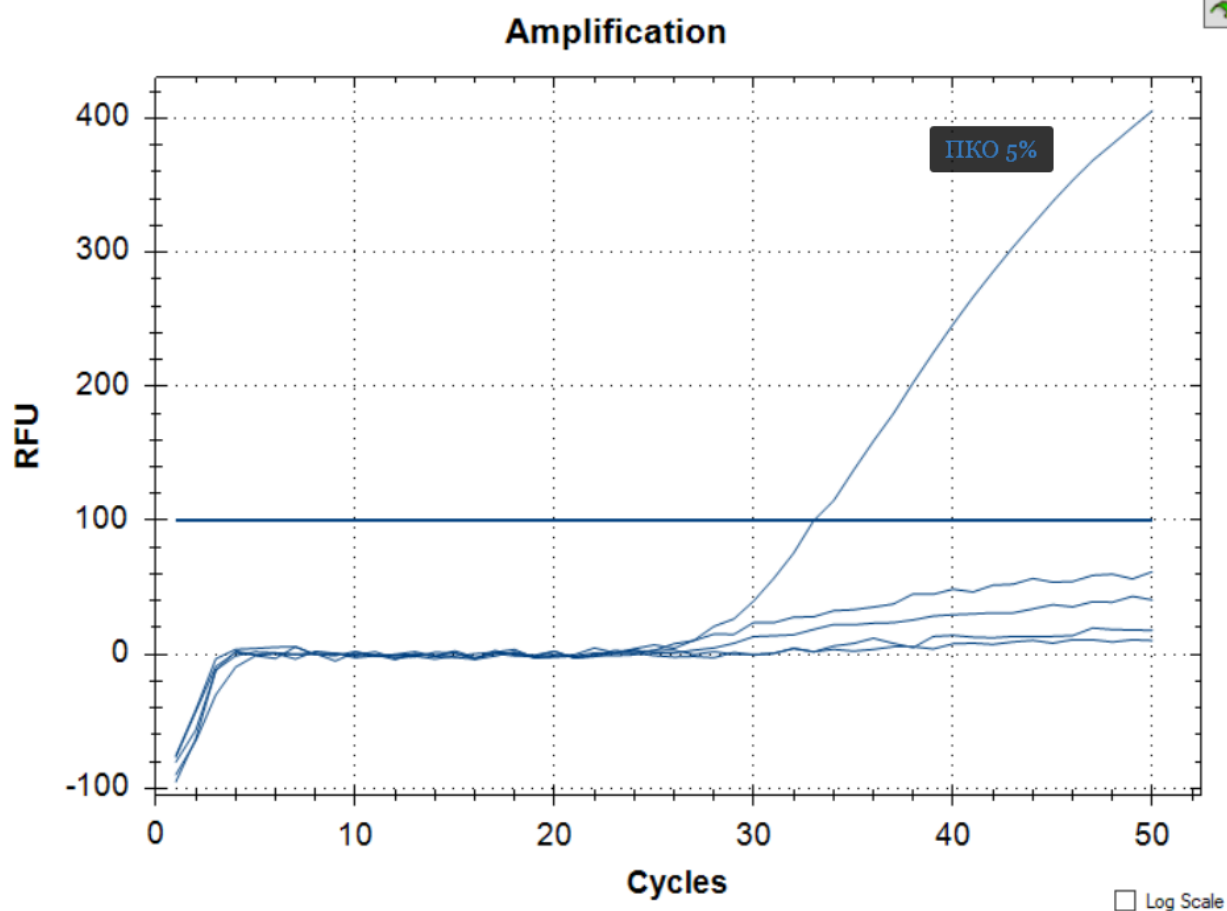


Рис. 10. Кривые флуоресценции для проб без мутации, контаминированных материалом предыдущего среза, и ПКО 5% – для наглядности отключено отображение канала HEX. Следует помнить, что при рекомендуемом содержании опухолевой ткани в срезе в 20-30% более, содержание мутации в исследуемом образце в большинстве случаев будет примерно таким же, поэтому необходимо крайне осторожно относиться к результатам, демонстрирующим низкие относительные концентрации мутации (1-2%) и анализировать возможные причины возникновения неспецифики.

Уровни неспецифического сигнала для различных мутаций гена NRAS приведены в таблице:

	Реакционная смесь		ПКО							ОКО	
			G12D	G12C	G12S	G13D	G13R	Q61K	Q61L		Q61R
1	G12D	Ct	22,19								-
		FAM/RFU	2802								
2	G12C-	Ct		22,18	22,96						-
		FAM/RFU		1462	692						
3	G12S	Ct		31,74	22,55						-
		FAM/RFU		78,9	1614						
4	G13D	Ct				22,34					-
		FAM/RFU				2642					
5	G13R	Ct					22,63				-
		FAM/RFU					1764				
6	Q61K	Ct						22,58			-
		FAM/RFU						1260			
7	Q61L	Ct							23,24		-
		FAM/RFU							1830		
8	Q61R	Ct							25,6	22,63	-
		FAM/RFU							511	2481	