

**Краткие рекомендации по использованию наборов реагентов производства
ООО «ТестГен» «Тест-KRAS-ткань», «Тест-NRAS-ткань», «Тест-BRAF-ткань-
мульти», «Тест-EGFR-ткань-мульти»**

Пожалуйста, ознакомьтесь с материалом до использования соответствующих наборов реагентов.

1. Оценка пригодности FFPE-блоков: по результатам морфологического исследования врачом-гистологом опухолевые зоны должны занимать не менее 50-60 % площади ткани в срезе с FFPE-блока, зоны некроза и кровоизлияния в совокупности должны занимать не более 15 % площади ткани в срезе с FFPE-блока.

2. Оптимальным является спектрофотометрическая и флуориметрическая оценка образца после выделения (показатель A260/280 должен быть выше 1,6, концентрация ДНК должна находиться в диапазоне от 1 до 50 нг/мкл). Наборы обладают широким диапазоном входной концентрации ДНК, но целесообразно брать в работу от 5 до 30 нг/мкл.

3. Для работы с наборами необходимо использовать ПЦР-пробирки объемом 0,2 мкл с оптически прозрачными плоскими крышками («Optically clear for fluorescence detection»), так как LoD (предел обнаружения) теста зависит от интенсивности сигнала в пробирке. Чем выше процент содержания мутации в образце, тем выше подъем кривой по каналу спецификации FAM.

Рекомендуемые производители ПЦР-пробирок:

| | Производитель, наименование | Артикул |
|---|--|--------------------|
| 1 | Комбо упаковка: стрипы SSI-3111 и плоские крышки SSI-3105 | SSI-3111, SSI-3105 |
| 2 | Пробирки ПЦР МАХУАМР™, прозрачные, плоская крышка, 0.2 мл, Tarsons | 510051 |
| 3 | PCRN-8H Микропробирки для ПЦР объем 0,2 мл, стерильные, стрипованные высокопрофильные 120 шт/уп, GenFollower | PCRN-8H |
| 4 | Genaxu PCR Strip Tubes | GEN-0208-FCC-PCR |

4. Разрешенными к применению являются следующие амплификаторы:

- «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011 г.);

- «CFX96» («Bio-Rad», США, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 г.);

- «QuantStudio 5» («Thermo Fisher Scientific», США, регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 г.).

- «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 г.) (кроме теста «Тест-EGFR-ткань-мульти»)

Программа амплификации указана для конкретной модели амплификатора в инструкции к набору реагентов.

При использовании приборов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ96» необходимо использовать стандартные заводские настройки экспозиции по каналам FAM и HEX (обычно по 1000, за уточнением необходимо обратиться в техническую поддержку компании-производителя оборудования). После работы с реагентами других производителей, которые требуют иных значений экспозиции, перед постановками на реагентах производства «ТестГен» требуется проверить и вернуть уровни экспозиции к заводским параметрам.

При использовании прибора «Rotor-Gene Q» в окне «Авто-оптимизация уровня сигнала» для всех детектируемых каналов необходимо «Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции», поскольку оптимизация происходит при условиях, максимально близких к условиям дальнейших

измерений сигнала в ходе анализа. Диапазон флуоресцентного сигнала выставляется по умолчанию (от 5 до 10 FI).

5. Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 5–10 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца. Установка правильной пороговой линии играет важную роль в дальнейшей интерпретации результатов.

6. Регистрация и интерпретация результатов.

В случае использования амплификатора «RotorGene Q» необходимо активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction).

В случае использования амплификаторов «CFX96» и «QuantStudio 5» может возникнуть необходимость коррекции базовой линии (например, в случае, если графики имеют «наклонную» форму на первых циклах амплификации или вид «наклонных» прямых).

При использовании «CFX96» необходимо выбрать один флуорофор, графики по которому требуется скорректировать, в разделе «Settings» выбрать «Baseline Threshold...», далее в диалоговом окне выделить нужные ячейки и указать C_t для диапазона, по которому следует провести коррекцию. Для диапазона следует использовать наиболее линейный участок, начинающийся после флуоресцентных искривлений графика флуоресценции в начале амплификации («Baseline Begin») и заканчивающийся на 2–4 цикла раньше, чем экспоненциальный подъем сигнала («Baseline End»). Обычно примерные интервалы 5–20 или 10–25.

При использовании амплификатора «QuantStudio 5»: при необходимости следует также указать аналогичный диапазон в опции меню «Analysis settings» (разделы «Baseling Start Cycle» и «End Cycle»).

7.1. Если КВМ (контроль взятия материала) по HEX/Yellow $C_t \leq 35$, однако кривые выходят гораздо ниже ПКО и других проб, имеют не S-образные формы, это может говорить об ингибировании ПЦР. Особенно часто это наблюдается при нарушении технологии подготовки FFPE-блоков, например, использовании не 10 % нейтрального забуференного формалина (вплоть до отсутствия выхода кривых HEX). В этом случае правильная интерпретация становится затруднительной, так как положительный сигнал мутации тоже может не детектироваться. В пигментированных образцах меланомы меланин не всегда до конца вымывается при экстракции ДНК и может ингибировать ПЦР. В этом случае рекомендуется более сильное разбавление исходного раствора ДНК элюентом и постановка серии разведений.

7.2. Получение положительного результата по каналу FAM по нескольким праймер-миксам (мультиплексам) у одного образца в рамках одной постановки возможно при высоком содержании мутации в образце. Небольшая кросс-специфичность наблюдается в реакционных смесях, детектирующих замену нуклеотида в той же позиции последовательности ДНК (например, в наборах «Тест-KRAS-ткань» в 12-м кодоне и «Тест-BRAF-ткань-мульти» в 600-м кодоне). В этом случае неспецифичные подъемы на других праймер-миксах (мультиплексах) не учитываются при интерпретации результата, и выдается только основная мутация, то есть валидный результат соответствует смеси с самой высокой кривой (по RFU) и с наименьшим показателем C_t по каналу FAM. Примеры перекрестных результатов для образцов с высоким содержанием какой-либо из детектируемых мутаций в гене *BRAF* представлены в инструкции к набору реагентов. Примеры перекрестных результатов для образцов с высоким содержанием какой-либо из детектируемых мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* представлены на сайте изготовителя (testgen.ru → «Техподдержка» → «Часто задаваемые вопросы» → «Онкология»).

7.3. Обычно значение RFU в пробирке коррелирует с процентом содержания мутации в образце (чем выше концентрация мутации, тем выше значение RFU). При использовании амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96», в связи с особенностями приборов, чтобы не пропускать невысокие специфические подъемы, соответствующие выявляемым мутациям, следует внимательно изучать каждый график, в том числе на исходных данных (рисунок 1).

Однако важно отличать специфические низкие подъемы от неспецифических. Для этого требуется сравнивать сигналы по каналу FAM образца, ОКО и проб, не содержащих мутацию. В ряде случаев возможен неспецифический подъем кривой флуоресценции по каналу FAM при отсутствии искомой мутации, например, при загрязнении лезвия предыдущим образцом, слабой контаминации мутантной ДНК, из-за краевого эффекта термоблока у некоторых моделей амплификаторов, неверной установки высоты пороговой линии.

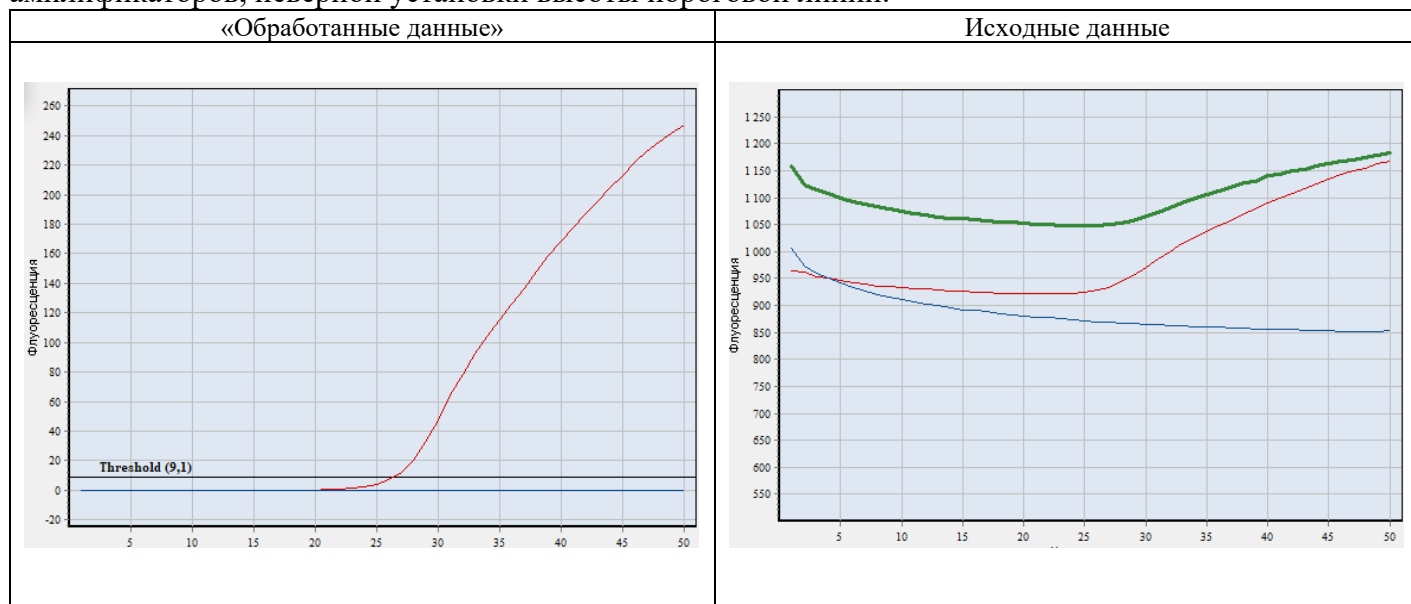


Рисунок 1. Пример работы с исходными данными на приборе «ДТпрайм», канал FAM; красный график – ПКО, зеленый график – исходный образец, синий – ОКО. На обработанных у образца не регистрируется увеличение RFU, однако увеличение прослеживается на исходных данных, образец является положительным по выявляемой мутации.

8. Успешность и правильность обнаружения мутаций зависит от целостности образца и количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в образце. Ткань опухоли не является гомогенной, в связи с этим результаты анализа разных срезов одного и того же парафинового блока, секций той же самой опухоли или ее метастазов могут не совпадать. Кроме того, образцы опухоли могут содержать большую долю нормальной ткани при низкой концентрации мутантных клеток.

9. По всем вопросам, возникающим при эксплуатации реагентов, просьба обращаться в службу технической поддержки компании:

Тел.: +7 927 981 58 81 help@testgen.ru