

Регистрационное удостоверение  
№ ФСР 2010/08415**Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом полимеразной цепной реакции****ОнкоГенетика****Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития рака молочной железы, методом ПЦР в режиме реального времени****ОнкоГенетика BRCA****Комплект положительных контрольных образцов****ПК BRCA****Информация о наборе****Назначение:**

Набор реагентов ОнкоГенетика предназначен для определения аллельных вариантов генов человека, ассоциированных с риском развития онкопатологии.

Комплект реагентов ОнкоГенетика BRCA и комплект положительных контрольных образцов ПК BRCA предназначены для определения аллельных вариантов генов человека *BRCA1* (мутации 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTA AAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA) и *BRCA2* (мутация 6174delT), ассоциированных с риском развития рака молочной железы и рака яичников.

**Метод:**

Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени; анализ кривых плавления, качественный анализ.

**Материал для исследования:**

Периферическая кровь.

**Выделение ДНК:**

Рекомендуются комплекты реагентов для выделения ДНК ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технология»).

**Особенности комплекта:**

Одновременная детекция – в одной пробирке определяются два аллельных варианта гена.

Внутренний контроль (ВК) – позволяет оценить количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

**Приборное обеспечение:**

Амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТлайт<sup>1</sup>, ДТпрайм<sup>2</sup> и ДТ-96 (для ДТ-322 функция контроля количества ДНК в каждой пробирке не поддерживается); версия программного обеспечения не ниже 7.5.5.23.

**Внимание!** Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании.

**Количество определений:**

48<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

<sup>2</sup> – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.

<sup>3</sup> – комплект ПК BRCA рассчитан на 48 определений при условии постановки анализируемых образцов группами по 5 образцов.

## Состав набора

Реактив	Количество	
<b>Комплект реагентов ОнкоГенетика BRCA</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Смеси для амплификации:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>[BRCA1: 185delAG] 960 мкл 1 пробирка</li> <li>[BRCA1: 4153delA] 960 мкл 1 пробирка</li> <li>[BRCA1: 5382insC] 960 мкл 1 пробирка</li> <li>[BRCA1: 3819delGTAAA] 960 мкл 1 пробирка</li> <li>[BRCA1: 3875delGTCT] 960 мкл 1 пробирка</li> <li>[BRCA1: 300 T&gt;G (Cys61Gly)] 960 мкл 1 пробирка</li> <li>[BRCA1: 2080delA] 960 мкл 1 пробирка</li> <li>[BRCA2: 6174delT] 960 мкл 1 пробирка</li> </ul> </li> <li>• ПЦП-буфер 3,84 мл 1 флакон</li> <li>• Таq-АТ-полимераза 192 мкл 1 пробирка</li> <li>• Минеральное масло 7,68 мл 1 флакон</li> </ul>		
<b>Комплект реагентов ПК BRCA</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Положительные контрольные образцы:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>К+1 [гомозиготный по нормальному аллелю] 270 мкл 1 пробирка</li> <li>К+2 [гетерозиготный] 270 мкл 1 пробирка</li> </ul> </li> </ul>		

### Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля

Название смеси для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
BRCA1: 185delAG	Ins	Del	-	ВК	-
BRCA1: 4153delA	Ins	Del	-	ВК	-
BRCA1: 5382insC	Del	Ins	-	ВК	-
BRCA1: 3819delGTAAA	Ins	Del	-	ВК	-
BRCA1: 3875delGTCT	Ins	Del	-	ВК	-
BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly)	T	G	-	ВК	-
BRCA1: 2080delA	Ins	Del	-	ВК	-
BRCA2: 6174delT	Ins	Del	-	ВК	-

## Инструкция по применению

### 1. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

**Внимание!** Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует  $Cp \leq 32,0$  на канале детекции ВК (Cy5). При использовании меньшего количества ДНК ( $Cp > 32,0$ ) производитель не гарантирует корректную работу набора.

- 1.1. Промаркируйте для каждого определяемого полиморфизма необходимое количество пробирок для амплификации объемом 0,2 мл (по одной для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца «К-», положительных контрольных образцов «К+1» и «К+2»).

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Для каждого полиморфизма нужно промаркировать 8 пробирок – 5 для исследуемых образцов, 1 для «К-» и 2 для «К+». Общее количество пробирок для всех полиморфизмов – 64.

	185delAG	4153delA	5382insC	3819delGTAAA	3875delGTCT	300 T>G (Cys61Gly)	2080delA	6174delT
Образец 1	√	√	√	√	√	√	√	√
Образец 2	√	√	√	√	√	√	√	√
Образец 3	√	√	√	√	√	√	√	√
Образец 4	√	√	√	√	√	√	√	√
Образец 5	√	√	√	√	√	√	√	√
«К-»	√	√	√	√	√	√	√	√
«К+1»	√	√	√	√	√	√	√	√
«К+2»	√	√	√	√	√	√	√	√

- 1.2. Встряхните пробирки со смесью для амплификации в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- 1.3. Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждого полиморфизма отдельно).

- 1.4. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-AT-полимеразой в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- Внимание!** Taq-AT-полимеразу необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
- 1.5. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-AT-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:
- 10 × (N+1) мкл ПЦР-буфера,
  - 0,5 × (N+1) мкл Taq-AT-полимеразы,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «K–» и «K+».
- Например, необходимо проанализировать 5 образцов, 1 «K–» и 2 «K+». Промаркированных пробирок – 64. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы для 65 (64+1) пробирок, т.е. 650 мкл ПЦР-буфера + 32,5 мкл Taq-AT-полимеразы.
- 1.6. Встряхните пробирку в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- Внимание!** Смесь ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием.
- 1.7. Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы.
- Внимание!** После добавления смеси ПЦР-буфера и Taq-AT-полимеразы в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп. 1.8 – 1.13.
- 1.8. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 1.9. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.
- Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (8 шт. для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.
- 1.10. Внесите в пробирки, маркированные «K–», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК. Внесите в пробирки, маркированные «K+1» и «K+2», по 5,0 мкл соответствующих положительных контрольных образцов.
- 1.11. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
- 1.12. Установите все пробирки в блок амплификатора детектирующего.
- 1.13. Запустите программное обеспечение RealTime\_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «BRCA.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тесты «BRCA\_185delAG»; «BRCA\_4153delA»; «BRCA\_5382insC»; «BRCA\_3819delGTAA»; «BRCA\_3875delGTCT»; «BRCA\_300T>G»; «BRCA\_2080delA»; «BRCA\_6174delT» (или используйте многотестовый режим «BRCA»), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. п.1.12) и проведите ПЦР.

**Примечание.** Тип пробирки для отрицательных и положительных контрольных образцов следует указывать как «Образец».

## 2. **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для амплификаторов детектирующих.

В образцах, прошедших ПЦР и содержащих достаточное для корректного анализа количество ДНК, программа определяет генотип исследуемого образца. Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК (менее 1,0 нг на пробирку, Cp>32,0 на канале детекции ВК) программа определяет недостоверный результат («нд»).

В бланке ответа по ОнкоГенетике в виде таблицы указываются генотипы образца по исследованным полиморфизмам (мутациям) с краткой характеристикой и заключением по результатам генотипирования.

**Внимание!** В связи с высокой медицинской и социальной значимостью статуса носителя мутации в гене *BRCA1* или *BRCA2* **рекомендуется** проводить повторное генотипирование гетерозиготных образцов, начиная с этапа выделения ДНК.

## **Условия хранения и эксплуатации**

Смесь для амплификации, ПЦР-буфер, минеральное масло и положительные контрольные образцы следует хранить при температуре 2–8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности.

Taq-AT-полимеразу следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом полимеразной цепной реакции (ОнкоГенетика), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, тел./факс +7 (495) 980-45-55, [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)

Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru)

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

[http://www.dna-technology.ru/customer\\_support/](http://www.dna-technology.ru/customer_support/)

Генотипы и температуры плавления аллельных вариантов (только для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96)

	BRCA_185delAG		BRCA_4153delA		BRCA_5382insC		BRCA_3819delGTAAA	
	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C
Ins/Ins (Del/Del для 5382insC)	56,4	49,3	53,0	46,6	52,9	41,6	54,7	43,2
Del/Del (Ins/Ins для 5382insC)	44,4	57,8	46,0	52,6	46,9	53,1	37,2	53,7
Ins/Del (Del/Ins для 5382insC)	55,4	56,8	52,5	52,6	52,4	51,1	54,7	53,2

	BRCA_3875delGTCT		BRCA_300 T>G (Cys61Gly)		BRCA_2080delA		BRCA_6174delT	
	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C	Fam, Tm°C	Hex, Tm°C
Ins/Ins (T/T для 300T>G)	60,1	50,2	58,7	46,2	52,9	47,2	51,3	40,8
Del/Del (G/G для 300T>G)	50,1	57,2	55,2	59,7	46,4	52,2	40,8	49,8
Ins/Del (T/G для 300T>G)	60,1	57,2	58,2	59,2	52,9	52,2	50,8	48,8