



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«10» октября 2017 г

ИНСТРУКЦИЯ по применению

Набор реагентов для выявления мРНК гена *PCAZ* и
определения уровня его экспрессии методом
двустадийной ОТ-ПЦР-РВ (Проста-Тест)
по ТУ 9398-003-97638376-2015 в исполнениях:

- 1) «Проста-Тест-12» на 12 определений;
- 2) «Проста-Тест-24» на 24 определения

ТУ 9398-003-97638376-2015

Содержание

1. Назначение	3
2. Характеристики набора	4
3. Принцип действия	6
4 Аналитические и диагностические характеристики набора	7
5. Меры предосторожности при работе с набором	8
6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	9
7. Анализируемые пробы	11
8. Подготовка компонентов набора для исследования	15
9. Проведение анализа	17
10. Регистрация и интерпретация результатов	22
11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора	25
12. Список сокращений	25
13. Утилизация	25
14. Гарантийные обязательства, контакты	26

1. Назначение

Назначение: набор реагентов предназначен для выявления отношения количества некодирующей мРНК гена *PCAZ* к уровню мРНК гена *KLK3* методом обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, в пробе РНК человека, выделенной из образцов свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка, полученного центрифугированием или фильтрованием мочи, собранной после массажа простаты, в целях поддержки диагностики рака предстательной железы, а также получения дополнительного критерия при назначении первой или повторной биопсии предстательной железы при обследовании мужчин в возрасте от 40 лет.

Клиническая значимость теста, выполняемого с помощью набора реагентов, состоит в поддержке диагностики патологии – рак предстательной железы, с помощью определения относительного уровня экспрессии гена *PCAZ*.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология, онкоурология.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК человека, выделенной из образцов свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка, полученного центрифугированием или фильтрованием мочи, собранной после массажа простаты.

Принцип определения.

Ген *PCAZ* расположен на хромосоме 9 в районе 9q21–22 и имеет размер 23,1 тыс. пар оснований. Ген состоит из 4 экзонов, которые содержат 7 сайтов полиаденилирования. В настоящее время описано несколько альтернативных изоформ зрелой матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), транскрибируемой на матрице гена *PCAZ*, и почти во всех изоформах отсутствует экзон 2. Наиболее часто в клетках экспрессируются изоформы, содержащие экзоны 1, 3 и 4а либо 4б. Анализ гипотетических полипептидов, кодируемых открытыми рамками считывания мРНК *PCAZ*, не выявил гомологий с описанными ранее белками. Все эти данные указывают на то, что *PCAZ* относится к некодирующим РНК. Ген *PCAZ* оверэкспрессируется в тканях злокачественных

опухолей предстательной железы, а РНК-продукт этого гена может присутствовать в моче и эякуляте. В связи с этим выявление отношения количества некодирующей мРНК гена *PCAZ* к уровню мРНК гена *KLK3* в биологическом образце может быть использован для неинвазивной диагностики рака предстательной железы и служить дополнительным критерием при назначении пациенту первой или повторной биопсии предстательной железы.

Показания к применению. Набор реагентов рекомендуется использовать при обследовании мужчин в возрасте от 40 лет на наличие онкологических процессов предстательной железы перед назначением первой или повторной биопсии.

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля.

Общее время проведения анализа составляет 2-2,5 ч.

2. Характеристики набора

Наборы реагентов «Проста-Тест» выпускается в двух вариантах исполнения:

- 1) «Проста-Тест-12» на 12 определений;
- 2) «Проста-Тест-24» на 24 определения.

Набор реагентов «Проста-Тест-12» на 12 определений рассчитан на проведение 12 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая положительные и отрицательные контроли.

Набор реагентов «Проста-Тест-24» на 24 определения рассчитан на проведение 24 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая положительные и отрицательные контроли.

Состав набора:

Набор реагентов состоит из комбинированного комплекта реагентов:

- комплект для проведения реакции обратной транскрипции «Проста-Тест» ОТ;
- комплект для проведения ПЦР амплификации «Проста-Тест» ПЦР.

Наборы реагентов на 12 и 24 определения включают:

Наименование комплекта	Реактив	Описание	Количество	
			12 определений	24 определения
«Проста-Тест» ОТ	ОТ ферменты, ОТ ф	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (48 мкл)	1 пробирка (96 мкл)
	ОТ буфер, ОТ б	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (180 мкл)	1 пробирка (360 мкл)
	ОТ DTT, DTT	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (48 мкл)	1 пробирка (96 мкл)
	ОТ праймеры, ОТ п	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (12 мкл)	1 пробирка (24 мкл)
«Проста-Тест» ПЦР	Смесь для ПЦР COMT, COMT	Прозрачная жидкость розового цвета	1 пробирка (576 мкл)	1 пробирка (1152 мкл)
	Смесь для ПЦР KLK3, KLK3	Прозрачная жидкость розового цвета	1 пробирка (576 мкл)	1 пробирка (1152 мкл)
	Смесь для ПЦР PCA3, PCA3	Прозрачная жидкость розового цвета	1 пробирка (576 мкл)	1 пробирка (1152 мкл)
	Тaq-полимераза, Тaq	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (72 мкл)	1 пробирка (144 мкл)
	ПКО, К+	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (270 мкл)	1 пробирка (540 мкл)
	ОКО, К-	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (270 мкл)	1 пробирка (540 мкл)

3. Принцип действия

Определение относительного уровня экспрессии гена *PCAZ* методом обратной транскрипции и последующей количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя четыре этапа:

- А) реакция обратной транскрипции;
- Б) ПЦР-амплификация ДНК;
- В) гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;
- Г) интерпретация результатов и расчёт относительного уровня экспрессии гена *PCAZ*.

С пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции в реакционном буфере при помощи праймеров и фермента MMLV ревертазы. С полученными в результате обратной транскрипции пробами кДНК проводятся реакции амплификации участков транскриптов генов *PCAZ*, *KLK3* и *COMT* в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы (см. раздел 9). В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются Taq-полимеразой, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Продукты амплификации всех задействованных в реакции генов детектируется по каналу, соответствующему флуорофору FAM.

4 Аналитические и диагностические характеристики набора

4.1 Аналитические характеристики:

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к мРНК генов <i>COMT</i> , <i>KLK3</i> и <i>PCAZ</i> человека
Аналитическая чувствительность	100 копий РНК ¹
Диапазон количества тотальной РНК, пригодного для выполнения исследования	min 1 мкг, max 5 мкг ²
Значения уровня PCA3, соответствующие норме	< 35 ³

4.2 Диагностические характеристики:

4.2.1 В исследованиях с образцами проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка:

Диагностическая чувствительность – 78,3 % (с доверительной вероятностью 90% доверительный интервал = 68,3 % - 88,3 %),

Диагностическая специфичность – 81,5 % (с доверительной вероятностью 90% доверительный интервал = 72,8 % - 90,2 %).

4.2.2 В исследованиях с образцами проб РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка:

Диагностическая чувствительность – 78,3 % (с доверительной вероятностью 90% доверительный интервал = 68,3 % - 88,3 %),

Диагностическая специфичность – 81,5 % (с доверительной вероятностью 90% доверительный интервал = 72,8 % - 90,2 %).

¹ При выделении РНК рекомендованным набором (см. п.7.1.2) из свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка объёмом 50-300 мкл.

² мРНК составляет 2-3 % от тотальной РНК. Диапазона количества тотальной РНК необходимо придерживаться при внесении выделенной РНК в реакционную смесь для обратной транскрипции. Данное количество соответствует концентрации РНК 30-180 нг/мкл при внесении 26 мкл РНК в реакционную смесь для обратной транскрипции объёмом 50 мкл согласно схемы (см. раздел 9).

³ Диагностический порог относительного уровня экспрессии гена PCA3 составляет 35. Принцип интерпретации результатов см. раздел 10.

Специфичность анализа определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам генов, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции.

5. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2Б в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «Проста-Тест», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «Проста-Тест» обладают низкой упругостью пара, и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Проста-Тест» не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

- Не использовать набор по истечению срока годности.

- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Оборудование:

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).

2. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (типа «Eppendorf», Германия).

4. Холодильник от +2 до +8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

5. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, Real-Time CFX96 Touch («BioRad», США), «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия) или эквивалентные.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, до 200 мкл, до 100 мкл, до 20 мкл и до 10 мкл. (например, «Axygen», США).

2. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

3. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

4. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

5. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:

а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например «Axygen», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).

б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «CFX96», «ДТ-Прайм»).

6. ПЦР-планшеты (могут использоваться вместо пробирок, указанных в пункте 5).

7. Оптически прозрачная пленка для заклеивания планшетов.

9. Стерильный физиологический раствор (например, НПП «ПанЭко», Россия).

10. Минеральное масло (для предотвращения испарения смеси при использовании для проведения реакции обратной транскрипции термостата без нагревающейся крышки).

7. Анализируемые пробы

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», Москва, 2009 г.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК человека, выделенной из образцов свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка, полученного центрифугированием или фильтрованием мочи, собранной после массажа простаты.

Для транспортировки и хранения образцов клеточных осадков мочи (материал для выделения РНК) рекомендуется использование среды для стабилизации РНК в биологических образцах, например, фиксатора IntactRNA (производства «Евроген», Россия) или аналогичных, предназначенных для сохранения и транспортировки с одновременной стабилизацией РНК. Рекомендуемый минимальный объем среды для сохранения и стабилизации РНК – 1,0 мл на 50-300 мкл клеточного осадка мочи.

7.1 Процедура получения анализируемого биологического материала

7.1.1 Отбор проб

1. Перед взятием клинического материала проводится пальцевой ректальный массаж предстательной железы (врачом урологом), целью которого является слушивание клеток предстательной железы в уретру,

2. Взятие первых струй мочи объемом 20-50 мл в стерильную промаркированную ёмкость проводится не позднее чем через 30 минут после массажа предстательной железы.

3. Подсчет клеток предстательной железы мочевого осадка перед выделением РНК не проводится, поскольку нормирование результатов анализа осуществляется по количеству мРНК гена *KLK3* непосредственно в ходе ОТ-ПЦР-РВ.

4. При выполнении анализа в клиничко-диагностических лабораториях подсчет концентрации и количества выделенной РНК не производится, поскольку качество выделенной РНК оценивается

во время проведения ПЦР по реакции СОМТ, чувствительной к РНК гена «домашнего хозяйства».

7.1.2 Экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов

(производится в помещении для обработки исследуемого материала)

Для экстракции РНК рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009, производства ООО "НПО ДНК-Технология", Россия, (ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.),

- Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «МАГНО-сорб» по ТУ 9398-106-01897593-2012, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (ФСР 2010/07265 от 05.05.2012),

или аналогичных наборов реагентов, предназначенных для выделения тотальной или матричной РНК из тканей, крови, культуры клеток. Экстракцию РНК рекомендуется проводить из всего объёма осадка (50-300 мкл).

Рекомендуемый минимальный объём раствора для элюирования РНК – 35 мкл.

7.1.3 Пробоподготовка

Рекомендуем соблюдать следующую процедуру получения клеточных осадков мочи (материал для выделения РНК)

1. Стерильные, свободные от РНКаз промаркированные пластиковые центрифужные пробирки объёмом 50, 15, 10 или 2 мл наполняют отобранными образцами мочи отдельными стерильными наконечниками или пипетками,

2. Пробирки на 50, 15 или 10 мл центрифугируют при 3 000 g в течение 20 минут или при 5 000 g в течение 15 минут; пробирки на 2 мл допускается центрифугировать при 10 000 g в течение 5 минут,

3. Не задевая осадков, отдельными стерильными наконечниками или пипетками удаляют надосадочную жидкость,

4. При использовании пробирок на 15, 10 или 2 мл, поверх осадков аккуратно настилают следующие порции мочи тех

же образцов отдельными стерильными наконечниками или пипетками, не допуская кросс-контаминации, повторяют пункты 2-4 до полного использования объёмов мочи,

5. При необходимости хранения осадков более суток, отдельными стерильными наконечниками добавляют к осадкам (объёмом 50-300 мкл) 1,0 мл среды для стабилизации и сохранения РНК, аккуратно ресуспендируют осадки пипетированием,

6. При центрифугировании образцов в пробирках на 50, 15 или 10 мл, переносят полученные суспензии в промаркированные стерильные пластиковые пробирки на 1,5 или 2 мл отдельными стерильными наконечниками.

7. Помещают пробирки в холодильную камеру с температурой $+2...+8^{\circ}\text{C}$ (не допуская замораживания).

7.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Интерферирующими элементами биопробы (мочи), которые могут исказить результаты анализа, являются крупные кристаллы органических и минеральных солей, видимые невооруженным глазом при перемешивании образца, обладающие механическими и химическими факторами воздействия на клетки простаты, содержащиеся в осадке. Для удаления кристаллов органических и минеральных солей рекомендуется однократная промывка клеточного осадка в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия (физрастворе) с последующим центрифугированием 10 минут при 5 000 g.

Для экстракции РНК из клинического образца, необходимой для проведения ПЦР-анализа чистоты, рекомендуется использовать наборы для выделения, указанные в п.7.1.2 настоящей инструкции.

Для контроля эффективности экстракции РНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внешнего контроля амплификации (ВКО Смесь для ПЦР СОМТ). Для проведения внешнего контроля амплификации необходимо добавить 7,5 мкл образца кДНК в реакцию по гену СОМТ. Ген СОМТ выбран в качестве индикатора прохождения реакции, поскольку относится к «генам домашнего хозяйства», что гарантирует его нахождение в различных биологических материалах человека.

Прохождение реакции говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

При отсутствии реакции результат следует считать недостоверным, и в этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется провести повторное выделение РНК для проведения ПЦР-анализа.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

1. Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание),

2. Не гарантируется получение достоверных результатов при использовании образцов осадков мочи, загрязнённых гемоглобином (кровью),

3. Не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

4. Полученную после процедуры выделения РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

5. Ошибки оператора при взятии биологического образца и в ходе процедуры выделения РНК, нарушение рекомендованной инструкции по применению набора реагентов может привести к получению недостоверных результатов.

6. Набор реагентов «Проста-Тест» не может быть использован у пациентов, которые принимают лекарства, влияющие на уровень простатспецифического антигена, такие как финастерид (Proscar), дутастерид (Avodart), альфузоксин (Uroxatral) и препарат антиандрогенной терапии (Lupron);

7. Простатэктомия, радиотерапия, биопсии простаты и др. могут повлиять на жизнеспособность ткани предстательной железы и, соответственно, на значение ПСА3.

7.3 Условия возможного хранения анализируемых образцов биологического материала:

1. Допускается кратковременное хранение образцов мочи в холодильнике (+2...+8 °С, не допуская замораживания) в течение не более чем 2 часов перед проведением процедуры пробоподготовки.

2. Полученные после процедуры пробоподготовки осадки в среде для стабилизации и сохранения РНК допускается хранить:

- при комнатной температуре – не более 3 суток,
- при +4 °С – не более 10 суток,
- при минус 16 °С⁴ – не более 30 суток,
- при минус 86 °С⁴ – длительно.

3. Полученные после процедуры пробоподготовки осадки без среды для стабилизации и сохранения РНК допускается хранить:

- при комнатной температуре – не более суток,
- при +4 °С – не более 3 суток,
- при минус 16 °С⁴ – не более 10 суток,
- при минус 86 °С⁴ – не более 3 месяцев.

4. Полученную после процедуры выделения РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

5. Препарат кДНК можно хранить:

- при +4 °С – не более суток,
- при минус 16 °С – не более месяца,
- при минус 86 °С – длительно.

8. Подготовка компонентов набора для исследования

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free».

⁴ Оттаивание и повторное замораживание при транспортировке и хранении не допускается. Если длительное сохранение отрицательной температуры в течение всего срока транспортировки образцов не гарантируется (есть риск оттаивания образцов) – следует транспортировать образцы при комнатной или низкой положительной температуре (+4 ... +8 °С).

А. Подготовка пробирок для проведения реакции обратной транскрипции.

Выбор пробирок для проведения реакции обратной транскрипции зависит от используемого термостата (амплификатора). Для внесения в пробирки реагентов и проб РНК используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением реакции обратной транскрипции. Смешивать реагенты для проведения необходимого количества реакций согласно разделу 9 настоящей инструкции.

1. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре реагенты набора для обратной транскрипции (ОТ буфер, ОТ DTT, ОТ праймеры) и осадить капли с крышек пробирок. ОТ ферменты доставать из морозильника непосредственно перед внесением, не допускать длительного (более 15 минут) хранения при комнатной температуре.

2. После размораживания тщательно перемешать содержимое пробирок (встряхнув пробирки на вортексе в течение нескольких секунд), осадить капли кратковременным центрифугированием.

3. Отобрать необходимое количество пробирок для обратной транскрипции, соответствующее количеству исследуемых образцов. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого термостата (амплификатора).

4. Подготовленные для обратной транскрипции пластиковые пробирки на 1,5 или 0,2 мл рекомендуется подержать под УФ-лучами в течение 20 минут в ламинарном или ПЦР-боксе, где будет проводиться приготовление реакций.

Б. Подготовка пробирок для проведения амплификации.

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора. Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетной таблице 2.

1. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре реагенты набора для амплификации (Смесь для ПЦР СОМТ, Смесь для ПЦР KLK3, Смесь для ПЦР РСАЗ, ОКО, ПКО) и осадить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием. Таq-полимеразу доставать из морозильника непосредственно перед внесением, не допускать длительного (более 15 минут) хранения при комнатной температуре.

2. После размораживания тщательно перемешать содержимое пробирок (встряхнув пробирки на вортексе в течение нескольких секунд или же перевернув 10 раз), осадить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием.

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Рекомендуемый порядок размещения реакций приведен в таблице 2. Для каждого исследуемого образца кДНК готовится по 6 ПЦР-пробирок, ещё 6 ПЦР-пробирок для каждой постановки реакции готовится для положительных и отрицательных контрольных образцов.

4. Подготовленные для ПЦР пластиковые пробирки рекомендуется подержать под УФ-лучами в течение 20 минут в ламинарном или ПЦР-боксе, где будет проводиться приготовление реакций.

9. Проведение анализа

Исследование состоит из следующих этапов:

- А) реакция обратной транскрипции;
- Б) ПЦР-амплификация ДНК;
- В) гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;
- Г) интерпретация результатов и расчёт относительного уровня экспрессии гена *РСАЗ* (подробно описано в главе 10).

А) Реакция обратной транскрипции

(производится в помещении для проведения ПЦР)

Субстратом для проведения реакции обратной транскрипции является РНК, выделенная согласно п. 7.1.

Во время приготовления реакций обратной транскрипции необходимо помнить, что РНК быстро деградирует, поэтому все манипуляции проводить без промедлений, не допуская длительных пауз между этапами. Реакционную смесь для обратной транскрипции начинать готовить только после полного завершения процедуры выделения РНК.

1. Добавить в каждую пробирку по 15 мкл ОТ буфера.⁵
2. Добавить в каждую пробирку по 4 мкл ОТ DTT.⁵
3. Добавить в каждую пробирку по 1 мкл ОТ праймеров.⁵
4. Добавить в каждую пробирку по 4 мкл ОТ ферментов.⁵
5. Стряхнуть капли кратковременным центрифугированием.
6. Отдельными наконечниками перенести по 26 мкл выделенной РНК в отдельные пробирки, перемешать пипетированием.

7. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе, стряхнуть капли кратковременным центрифугированием.

8. При использовании термостата без нагревающейся крышки наложить на содержимое пробирок минеральное масло для предотвращения испарения смеси.

⁵ При исследовании большого количества образцов (более 4), на усмотрение оператора, допускается сначала приготовить мастермикс для обратной транскрипции по следующей схеме:

Компонент	Количество образцов						
	2	3	4	5	6	7	8
ОТ буфер, мкл	33	49,5	66	82,5	99	115,5	132
ОТ DTT, мкл	8,8	13,2	17,6	22	26,4	30,8	35,2
ОТ праймеры, мкл	2,2	3,3	4,4	5,5	6,6	7,7	8,8
ОТ ферменты, мкл	8,8	13,2	17,6	22	26,4	30,8	35,2

Примечание: количество компонентов указано с 10 % запасом.

Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием. Внести по 24 мкл приготовленного мастермикса в чистые пробирки, соответствующие используемому термостату (амплификатору), для обратной транскрипции.

9. Поместить пробирки в термостат при температуре 38 °C на 90 минут.⁶

10. По окончании 90 минут установить на термостате температуру 70 °C и термостатировать ещё 10 минут.⁶

11. При необходимости, смесь после обратной транскрипции хранить до 1 суток при температуре +4 °C.⁶

Б) ПЦР-амплификация ДНК

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения реакции ПЦР-амплификации)

Реакционную смесь для ПЦР начинать готовить только после полного завершения реакции обратной транскрипции.

Общий объем реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!!!

Необходимо использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

1. Приготовление реакционных смесей для образцов, ПКО и ОКО рекомендуется проводить непосредственно в ПЦР-пробирках путём смешивания всех необходимых компонентов согласно расчетной таблице 3.⁷ Для этого:

⁶ Если для проведения реакции обратной транскрипции используется амплификатор, то применяется следующая программа амплификации (объём 50 мкл):

Температура, °C	Продолжительность, мин
38	90
70	10
4	хранение

⁷ При исследовании большого количества образцов (более 4), на усмотрение оператора, допускается сначала приготовить 3 отдельные реакционные смеси (COMT, KLK3 и PCA3) исходя из расчёта для каждой: $24 \times (n+2)$ мкл соответствующей смеси для ПЦР (COMT, KLK3 или PCA3) + $1,0 \times (n+2)$ мкл Taq-полимеразы (где «n» - количество исследуемых образцов кДНК). Перемешать содержимое пробирок на вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием. Внести по 12,5 мкл приготовленных реакционных смесей в соответствующие ПЦР-пробирки согласно таблице 2.

1.1. Расположить пробирки в 6 горизонтальных рядов, по $(n+1)$ пробирок в каждом ряду (горизонтально), где « n » – количество исследуемых образцов (см. табл. 2).

При этом в горизонтальных рядах будут располагаться реакционные смеси для каждого из трёх генов (*COMT*, *KLK3* и *PCAZ*), по 2 повторности (дубли) для каждого гена; в вертикальных рядах – опытные образцы кДНК и контрольные образцы.

1.2. Внести в $2 \times (n+1)$ пробирок, расположенные в двух верхних горизонтальных рядах, по 12 мкл смеси для ПЦР *COMT*⁷.

1.3. Внести в $2 \times (n+1)$ пробирок, расположенные в двух средних горизонтальных рядах, по 12 мкл смеси для ПЦР *KLK3*⁷.

1.4. Внести в $2 \times (n+1)$ пробирок, расположенные в двух нижних горизонтальных рядах, по 12 мкл смеси для ПЦР *PCAZ*⁷.

1.5. В каждую пробирку внести по 0,5 мкл Taq-полимеразы (всего $6 \times (n+1)$ пробирок)⁷.

Например (см. таб. 2), при исследовании 7 образцов, расположить пробирки в 6 горизонтальных рядов, по 8 пробирок в каждом ряду (горизонтально). Всего 48 пробирок. Внести в 16 пробирок, расположенных в 2 верхних горизонтальных рядах по 12 мкл смеси для ПЦР COMT. Внести в 16 пробирок, расположенных в 2 средних горизонтальных рядах по 12 мкл смеси для ПЦР KLK3. Внести в 16 пробирок, расположенных в 2 нижних горизонтальных рядах по 12 мкл смеси для ПЦР PCA3. Внести в каждую пробирку (всего 48) по 0,5 мкл Taq-полимеразы.

Таблица 2 – Рекомендуемый порядок расположения реакций (48-луночный планшет).

			Образцы							Конт-роли
			O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	
			1	2	3	4	5	6	7	
COMT	Д1	A								ПКО
	Д2	B								ОКО
KLK3	Д1	C								ПКО
	Д2	D								ОКО
PCA3	Д1	E								ПКО
	Д2	F								ОКО

O1–O7 – образцы с 1-го по 7-й,

Д1-Д2 – повторности (дубли) реакций.

Таблица 3 - Приготовление мастермиксов (в расчете на одну реакцию)

Тест	Мастермикс		
	Соответствующая смесь для ПЦР (COMT, KLK3 или PCA3), мкл	Тaq-полимераза, мкл	Образец, мкл
COMT	12	0,5	7,5
KLK3	12	0,5	7,5
PCA3	12	0,5	7,5

2. Внести по 7,5 мкл ОКО в реакции ОКО.

3. Внести по 7,5 мкл ПКО в соответствующие контрольные пробирки (см. табл. 2).

4. Внести по 7,5 мкл образцов кДНК в соответствующие пробирки, расположенные вертикально (см. табл. 2).

5. Заклеить ПЦР-планшет/заккрыть пробирки, убедиться, что все крышки или пленка прилегают плотно.

6. Открутить ПЦР-планшет/пробирки, чтобы собрать реакционную смесь на дне лунок, сохраняя правильную ориентацию плашки или серии пробирок.

В) Гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Приборы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование неоткалиброванного прибора может оказать влияние на характеристики теста.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации

№ блока	t, °C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин.	сек.			
1	95	5	00	1		цикл
2	94	0	10	50		цикл
	65	0	30		FAM	

9. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала по каналу FAM.

10. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM. Фиксируют

средний для двух дублей (повторностей) пороговый цикл (C_p) прохождения реакции каждого из генов: *COMT*, *KLK3*, *PCA3*.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Правильные результаты для ПКО характеризуются тем, что полученные пороговые циклы (C_p) реакций в ПКО составляют не более 35. Правильные результаты для ОКО – отсутствие прохождения реакции в каждом из отрицательных контрольных образцов (ОКО *COMT*, ОКО *KLK3*, ОКО *PCA3*).

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводят только при правильных результатах для ОКО и ПКО данной постановки.

Об эффективности выделения РНК и прохождении реакции обратной транскрипции судят по среднему для двух дублей (повторностей) пороговому циклу (C_p) прохождения реакции гена *COMT*: При среднем пороговом цикле (C_p) по гену *COMT* для данного образца выше 35 – эффективность выделения либо прохождения реакции обратной транскрипции оценивают как неудовлетворительную, а результат интерпретируют как невалидный. При среднем пороговом цикле (C_p) по гену *COMT* для данного образца менее 35 – эффективность выделения либо прохождения реакции обратной транскрипции оценивают как удовлетворительную, приступают к расчёту относительного уровня экспрессии гена *PCA3*.

Результаты интерпретируются на основании расчётов отношения *PCA3/KLK3*, по формуле⁸:

$$R = 1000 \times (1,92^{(C_{pKLK3} - C_{pPCA3})}),$$

где:

R – относительный уровень экспрессии гена *PCA3*,

C_{pKLK3} – средний для двух дублей (повторностей) пороговый цикл (C_p) прохождения реакции *KLK3*,

⁸ Bustin, Stephen A., ed. A-Z of Quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line, 2004-2006

СрРСАЗ⁹ – средний для двух дублей (повторностей) пороговый цикл (Ср) прохождения реакции РСАЗ,

1,92 – средняя эффективность реакций по генам *KLK3* и *РСАЗ*,

1000 – коэффициент, введенный для получения удобного, не дробного формата данных.

Например, значения Ср для гена *KLK3* получились 28,6 для первого дубля и 28,8 для второго дубля; значения Ср для гена *РСАЗ* – 33,2 и 33,4. Рассчитывается среднее Ср для каждого гена: 28,7 для *KLK3* и 33,3 для *РСАЗ*. Рассчитывается относительный уровень экспрессии *РСАЗ*:

$$R = 1000 \times (1,92^{(28,7-33,3)}) = 1000 \times (1,92^{-4,6}) = \\ = 1000 \times 0,04975 = 49,75$$

Принцип интерпретации результатов следующий:

– риск наличия онкологических процессов предстательной железы для данного образца высокий, если относительный уровень экспрессии гена *РСАЗ* более 35, а пороговый цикл (Ср) по гену *СОМТ* не больше 35.

– риск наличия онкологических процессов предстательной железы для данного образца низкий, если относительный уровень экспрессии гена *РСАЗ* не более 35, а пороговый цикл (Ср) по гену *СОМТ* не больше 35.

– результат анализа невалидный, если пороговый цикл (Ср) по гену *СОМТ* больше 35.

– результат анализа сомнительный, если Ср в двух повторностях (дублях) одного или обоих исследуемых генов (*KLK3* и/или *РСАЗ*) отличаются более чем на 5 циклов, или если показательный график по одному из дублей отсутствовал. Во втором случае расчёт уровня экспрессии гена *РСАЗ* проводится по единственному нормально построенному графику. Определение среднего Ср в этом случае не проводится.

⁹ Если графики по гену *РСАЗ* отсутствуют, а средний пороговый цикл реакции по гену *СОМТ* не более 35, пороговый цикл реакции по гену *РСАЗ* принимают за 50. Если при этом средний пороговый цикл реакции по гену *СОМТ* более 35 – результат анализа оценивают как невалидный.

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Условия хранения. Набор реагентов хранить при температуре от минус 20 до минус 40°C.

Смеси для ПЦР COMT, KLK3, PCA3 хранить в защищенном от света месте.

Условия транспортирования. Набор реагентов транспортировать при температуре от минус 18 до минус 25°C. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8°C не более трех суток.

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора. 12 мес.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора. 1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

12. Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в

соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «Проста-Тест» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «Проста-Тест» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента), направлять информацию по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),
432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9
Тел.: +7 (499) 705-03-75
www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81
Тел.: +7 927 737 83 40
E-mail: help@testgen.ru



Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

26 (двадцать шесть) листов

Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.

Тороповский



ООО «ТестГен»

Паспорт качества № 7

Набор реагентов для выявления
мРНК гена *PCA3* и определения
уровня его экспрессии методом
двустадийной ОТ-ПЦР-РВ
«Проста-Тест-12»
(на 12 определений)
по ТУ 9398-003-97638376-2015

Номер лота: 1608-286
Количество изделий
в партии: 4
Изготовлен: 08-2016
Срок годности: 08-2017

Наша версия
Генеральный директор
ООО «ТестГен» *А.И. Морозов*
Морозов А.И.



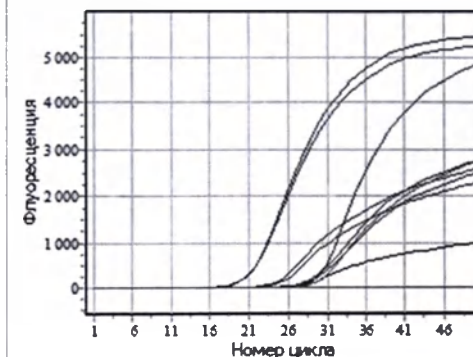
Состав и характеристики набора:

№п/п	Наименование показателя и	Характеристики и нормы	Полученный результат	Вывод о соответствии
1. Внешний вид				
1.1	ОТ ферменты, ОТ ф	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (48 мкл)	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (48 мкл)	Соответствует
1.2	ОТ буфер, ОТ б	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (180 мкл)	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (180 мкл)	Соответствует
1.3	ОТ DTT, DTT	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (48 мкл)	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (48 мкл)	Соответствует
1.4	ОТ праймеры, ОТ п	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (12 мкл)	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (12 мкл)	Соответствует
1.5	Смесь для ПЦР COMT, COMT	Прозрачная жидкость розового цвета, 1 пробирка (576 мкл)	Прозрачная жидкость розового цвета, 1 пробирка (576 мкл)	Соответствует
1.6	Смесь для ПЦР KLK3, KLK3	Прозрачная жидкость розового цвета, 1 пробирка (576 мкл)	Прозрачная жидкость розового цвета, 1 пробирка (576 мкл)	Соответствует
1.7	Смесь для ПЦР PCA3, PCA3	Прозрачная жидкость розового цвета, 1 пробирка (576 мкл)	Прозрачная жидкость розового цвета, 1 пробирка (576 мкл)	Соответствует
1.8	Тақ-полимераза, Тақ	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (72 мкл)	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (72 мкл)	Соответствует
1.9	ПКО, К+	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (270 мкл)	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (270 мкл)	Соответствует
1.10	ОКО, К-	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (270 мкл)	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка (270 мкл)	Соответствует
2	Комплектность	Инструкция, набор реагентов, паспорт	Инструкция, набор реагентов, паспорт	Соответствует
3	Маркировка	Наличие на пробирках и коробке	Наличие на пробирках и коробке	Соответствует
4	Упаковка:	Отдельные пластиковые пробирки, уложенные в картонную коробку	Отдельные пластиковые пробирки, уложенные в картонную коробку	Соответствует
5	Положительный результат ОТ ПЦР	Относительный уровень экспрессии гена <i>PCA3</i> в ПКО не менее 300	457,1	Соответствует
6	Отрицательный результат ОТ ПЦР	Относительный уровень экспрессии гена <i>PCA3</i> в ОКО не более 30	13,5	Соответствует
7	Аналитическая чувствительность	Прохождение реакций с КОЧ по всем трем генам во всех повторностях (не менее 6) не позднее 40 цикла	COMT 34,4; KLK3 34,5; PCA3 38,6	Соответствует
8	Коэффициент вариации порогового цикла (Cp) для повторностей КОЧ	≤ 3	0,47; 0,37; 0,55	Соответствует

Условия хранения: от минус 20 до минус 40°C

Условия транспортировки: от минус 18 до минус 25°C. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8°C не более трех суток.

Результат контроля качества



Набор соответствует ТУ 9398-003-97638376-2015

Дата выдачи паспорта: 03.08.2016

Штамп ОТК:





Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

2 (два) листов

Должность: ген. директор

Тороповский А.Н.

А.Н. Тороповский