

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2012 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырёв М.В.

«06» марта 2012 г.



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ 25 МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *CFTR* (МУКОВИСЦИДОЗА)
МЕТОДОМ ДНК-МИКРОЧИПОВ
«Муковисцидоз-БиоЧип»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Диагностический набор «Муковисцидоз-БиоЧип» предназначен для выявления мутаций в гене *CFTR*, наличие которых приводит к развитию наследственного заболевания муковисцидоз (МВ). Набор позволяет одновременно детектировать 25 наиболее часто встречающихся на территории Российской Федерации мутаций, связанных с развитием тяжелого фенотипа этого заболевания (Таблица 1).

1.2. МВ – моногенное заболевание, обусловленное мутацией гена *CFTR* (муковисцидозного трансмембранного регулятора) и характеризующееся поражением экзокринных желез жизненно важных органов и систем. МВ – одно из наиболее распространенных тяжелых наследственных заболеваний. Среди представителей европеоидной расы в среднем носителем мутантной аллели гена *CFTR* является каждый 25-й человек. Необходимость ранней диагностики муковисцидоза определяется следующими факторами:

- раннее начало лечения МВ обеспечивает более высокий терапевтический эффект и улучшает прогноз течения заболевания;
- своевременная постановка диагноза вносит ясность в понимание родителями состояния ребенка и позволяет им и больному вовремя адаптироваться к трудностям, связанным с хроническим заболеванием;
- своевременная постановка диагноза обоим родителям о носительстве мутантного гена *CFTR* позволяет семье вовремя решить необходимые вопросы, связанные с рождением здорового ребенка (генетическое консультирование, пренатальная диагностика МВ, планирование последующих беременностей);
- отсроченность диагноза, а следовательно, и отсутствие адекватной терапии, может привести к развитию необратимых патологических изменений в легких;
- при отсутствии лечения нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта могут привести к недостаточности питания и значительному отставанию в физическом развитии;
- несвоевременность постановки диагноза МВ может быть сопряжена с излишними, сложными, дорогостоящими диагностическими и лечебными мероприятиями, связанными с лечением осложнений МВ.

Таблица 1. Мутации в гене *CFTR*, детектируемые диагностическим набором

«Муковисцидоз-БиоЧип»

	Мутация	Частота среди всех носителей мутаций в гене <i>CFTR</i> (%)
1	F508del	64,7
2	Del ex2-3	8,8
3	2143delT	2,0
4	G542X	2,0
5	G551D	1,9
6	2184insA	1,8
7	W1282X	1,6
8	N1303K	1,3
9	3732delA	1,2
10	1717-1G>A	1,0
11	1677delTA	0,8
12	2183AA-G	0,8
13	S1196X	0,8
14	3821delT	0,8
15	R553X	0,8
16	1078delT	0,7
17	I507del	0,7
18	2789+5G>A	0,7
19	R1162X	0,6
20	3849+10kbC>T	0,5
21	G85E	0,4
22	621+1G>T	0,4
23	R347P	0,3
24	R347H	0,3
25	R334W	0,2

1.3. Набор предназначен только для применения *in vitro*.

1.4. Набор «Муковисцидоз-БиоЧип» может быть использован в клинической молекулярно-генетической диагностике для выявления носительства мутаций в гене *CFTR*.

1.5. Результаты, полученные с помощью диагностического набора «Муковисцидоз-БиоЧип», должны интерпретироваться специалистами только в контексте общей клинической картины. Производитель не гарантирует отсутствия мутаций в гене *CFTR*, не входящих в панель набора «Муковисцидоз-БиоЧип».

1.6. Набор адаптирован для применения на территории Российской Федерации и стран СНГ. Частота анализируемых с помощью диагностического набора «Муковисцидоз-БиоЧип» мутаций в гене *CFTR* может варьировать в разных популяциях.

1.7. Один набор рассчитан на проведение анализа 5 или 10-ти клинических образцов ДНК пациентов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Исследуемый анализ – 25 мутаций в гене *CFTR* (Таблица 1).

В основе анализа лежит метод обратной гибридизации на биочипе: синтетическая мишень иммобилизована на биочипе, а зондом является меченый цианином (Cy5) ПЦР-продукт (Рисунок 1).

Алгоритм проведения анализа:

1. Амплификация интересующих фрагментов ДНК пациента в ходе двухстадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР).
2. Гибридизация полученных продуктов ПЦР на твердой фазе (биочипе).
3. Сканирование флуоресценции биочипа.
4. Анализ результатов.



Рисунок 1. Принцип метода обратной гибридизации на биочипе

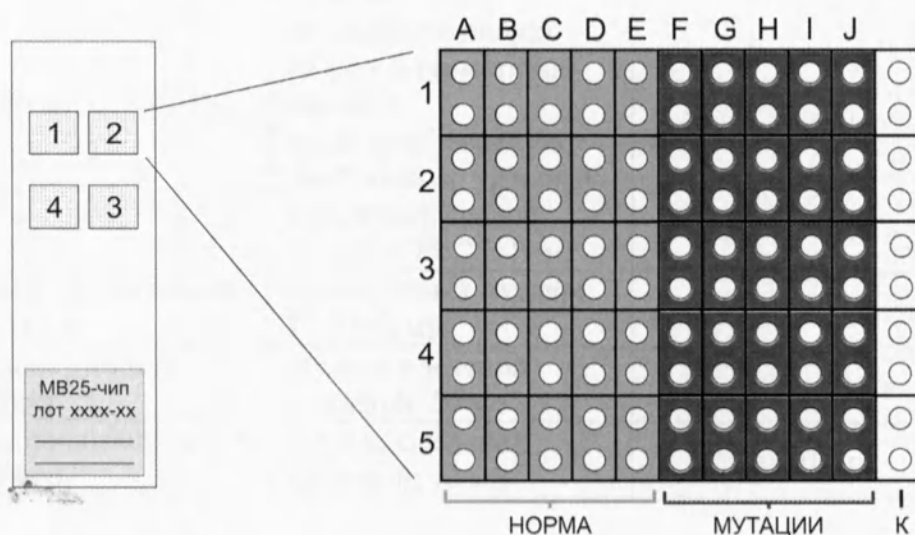


Рисунок 2. Схематическое изображение биочипа

Слева: Внешний вид биочипа. 1-4 – четыре копии биочипа.

Справа: Увеличенное изображение биочипа. Все мишени нанесены в виде парных точек. Поле A1 – E5 составляют мишени дикого типа. Поле F1 – J5 составляют мутантные мишени. Последний столбец К – контроль для позиционирования маски.

2.2. Состав набора

Диагностический набор «Муковисцидоз-БиоЧип» состоит из двух комплектов – компонентов для проведения полимеразной цепной реакции и набора для гибридизации.

Состав набора «Муковисцидоз-БиоЧип»					
Название	Компонент	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем в пробирке /флаконе,	Условия хранения
Компоненты для проведения полимеразной цепной реакции					
A1-A5	Смеси праймеров для ПЦР1.	Микропробирки с красными крышками; 0,5 мл	5	По 20 мкл	-18...-22°C
B1-B6	Смеси праймеров для ПЦР2.	Непрозрачные микропробирки с зелеными крышками; 0,5 мл	6	По 20 мкл	-18...-22°C
АБ	Амплификационный буфер	Микропробирка с бесцветной крышкой; 1,5 мл	1	1,2 мл	-18...-22°C
П	ДНК-полимераза	Микропробирка с желтой крышкой; 0,5 мл	1	20 мкл	-18...-22°C
Компоненты для гибридизации					
Биочип	Биочип	Биочип помещен в пластиковую гибридизационную камеру и герметично запаян в металлизированную пластиковую упаковку с инертной средой. Стекло - 75x25x1мм.	5		-18...-22°C
Камера	Гибридизационная камера	Пластиковый футляр; 70x34x2 мм	5		-18...-22°C
ББ	Блокирующий буфер	Флакон с зеленой крышкой; 50 мл	2	По 50 мл	-18...-22°C
ГБ	Гибридизационный буфер	Флакон с зеленой крышкой; 13 мл	1	10 мл	-18...-22°C

Примечание: Блокирующий и гибридизационный буферы можно хранить отдельно при температуре +2...+8 °C.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность

Минимальная допустимая концентрация ДНК в исследуемом образце – 1 нг/мкл.

3.2. Аналитическая специфичность

–Положительный контроль: наличие всех сигналов в поле дикого типа и отсутствие сигналов в поле мутаций при постановке с контрольным образцом дикого типа.

–Отрицательный контроль: отсутствие сигналов на биочипе при постановке гибридизации с использованием продуктов реакции ПЦР2, проведенной без добавления ДНК-матрицы из ПЦР1.

3.3. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора равна 95%

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Во избежание контаминации ДНК строго рекомендуется физическое разделение пре- и пост-амплификационных этапов: отдельные помещения, отдельные халаты, отдельные пипетки и другие лабораторные материалы.

4.3. Приготовление ПЦР-смесей должно проводиться с использованием наконечников с фильтрами.

4.4. Все манипуляции с биочипами должны проводиться в защищенном от пыли месте.

4.5. Не использовать компоненты набора после истечения срока их годности.

4.6. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.7. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.8. В наборе отсутствуют компоненты, содержащие потенциально опасные биологические материалы.

4.9. Удаление неиспользованных реактивов необходимо проводить в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

4.10. При работе с образцами биоматериала необходимо руководствоваться МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и соблюдать санитарно-эпидемические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1. Этап проведения амплификации (ПЦР)

–ПЦР-бокс;

–амплификатор для проведения ПЦР с нагреваемой крышкой (методика анализа с использованием набора «Муковисцидоз-БиоЧип» отработана на амплификаторах MyCycler, CFX (Bio-Rad) и Biometra;

–центрифуга/вортекс типа «Микро-спин FV-2400» с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин;

–пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5 - 10 мкл; на 5 - 50 мкл; на 20 - 200 мкл;

–стерильные пробирки на 0,2 мл или на 0,5 мл для ПЦР;

–пробирки типа «эппендорф» на 1,5 мл;

–штатив «рабочее место» для пробирок 0,2 или 0,5 мл;

–наконечники к пипеткам-дозаторам с фильтрами;

–вода ампулированная или деионизованная;

–перчатки резиновые без обсыпки;

–фильтровальная бумага;

–холодильник фармацевтический типа Sanyo MPR-414F.

5.2. Этап гибридизации

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 0,5 - 10 мкл; на 5 - 50 мкл; на 100 - 1000 мкл;
- наконечники к пипеткам-дозаторам с фильтрами;
- водяная баня или гибридизационная станция (протокол гибридизации отработан на станции HS 400 Pro (Tecan));
- пластиковый стакан объемом 50 мл;
- емкость стеклянная Хеллендаля;
- центрифуга для стекол Дастан ОПн-3.02 или ELMi CM-6;
- пробирка на 40 мл для центрифугирования стекол;
- перчатки резиновые без обсыпки.

5.3. Этап сканирования

- сканер для биочипов (этап сканирования отработан на сканерах ScanArray G_x (PerkinElmer), MArS (Ditabis) и PowerScanner (Tecan));
- штатив для стекол.

5.4. Анализ данных

- компьютер с предустановленным программным обеспечением для работы со сканером (ПО не входит в состав набора);
- регистрация результата может быть произведена при помощи специализированного ПО - MB25-СКАН.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа рекомендуется использовать образцы ДНК с концентрацией 1-300 нг/мкл. Геномная ДНК может быть получена из сухих пятен крови, цельной крови, либо букального эпителия. Для выделения ДНК из сухих пятен крови рекомендуется использование наборов производства компании Алкор Био.

***Примечание:** Количество биоматериала, необходимого для получения геномной ДНК человека указанной концентрации, зависит от эффективности выделения ДНК используемым набором для выделения.*

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Не рекомендуется размораживать-замораживать компоненты набора более 5 раз.

7.1. Полимеразная цепная реакция

Анализ включает в себя две последовательные ПЦР, в ходе которых синтезируются флуоресцентно-меченные зонды. Первая ПЦР состоит из 5-ти отдельных мультиплексных реакций (A1-A5) для каждого исследуемого образца. Вторая ПЦР – из 6-ти реакций (B1-B6).

7.1.1. Первый этап ПЦР

1) Разморозить пробирки с праймерами «A1»-«A5» и амплификационным буфером («AB»). Перед использованием все реагенты тщательно перемешать на вортексе. Удалить со стенок пробирок капли смеси коротким центрифугированием при комнатной температуре (+18...+25 °C) в течение 10 секунд при 2400 об/мин.

2) Взять необходимое количество пробирок (объемом 0,2 или 0,5 мл), соответствующее числу анализируемых образцов, промаркировать их и расположить в штативе.

3) Достать из набора пробирку «П» и установить ее в штатив.

4) «A1», «A2», «A3», «A4», «A5», «AB» и «П» готовы к использованию.

5) Для каждого образца приготовить рабочую смесь по протоколу:

«AB» (амплификационный буфер)	107 мкл
«П» (ДНК-полимераза)	2,8 мкл
Тестируемая ДНК	10 мкл
Общий объем:	119,8 мкл

Перемешать смеси на вортке и собрать капли коротким центрифугированием при комнатной температуре (+18...+25 °C) в течение 10 секунд при 2400 об/мин.

6) Для каждого анализируемого образца приготовить по 5 пробирок, подходящих для используемого типа амплификатора, и промаркировать их от 1 до 5. Аликвотировать каждую рабочую смесь в соответствующие пять пробирок по 22 мкл.

7) Добавить по 3 мкл каждой смеси праймеров «А1»-«А5» в соответствующие пробирки с рабочими смесями. Перемешать готовые смеси на вортке и удалить со стенок пробирок капли центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 секунд при 2400 об/мин.

Примечание: После приготовления смесей убрать все исходные компоненты в морозильную камеру на -18...-22 °C.

8) Поместить пробирки в амплификатор и провести реакцию по следующей программе:

Денатурация	+95 °C – 3 мин
6 циклов	+96 °C – 5 с
	+49 °C – 20 с
	+70 °C – 10 с
29 циклов	+96 °C – 2 с
	+53 °C – 10 с
	+68 °C – 10 с

9) Объединить продукты ПЦР1: в отдельную 1,5 мл пробирку типа «эппендорф» внести 700 мкл воды и добавить по 2 мкл из всех пяти ПЦР-смесей после проведения реакции ПЦР1.

Примечание: Объединенные и разбавленные в воде продукты ПЦР1 можно хранить в течение 7 дней в морозильной камере на -18...-22 °C.

7.1.2. Второй этап ПЦР

Внимание! ПЦР1 и ПЦР2 следует проводить в разных боксах. При отсутствии возможности пространственного разнесения ПЦР1 и ПЦР2 тщательно прожигать бокс ультрафиолетовым светом после постановки каждого анализа.

Внимание! При каждом проведении анализа необходимо включить в постановку ПЦР отрицательный контроль (ПЦР2 без ДНК из ПЦР1). В реакционную смесь для отрицательного контроля вместо объединенных продуктов ПЦР1 добавить 10 мкл воды.

1) Заранее разморозить пробирки «В1»-«В6» и «АБ». Перед использованием все реагенты тщательно перемешать на вортке. Удалить со стенок пробирок капли смеси коротким центрифугированием при комнатной температуре (+18...+25 °C) в течение 10 секунд при 2400 об/мин.

2) Взять необходимое количество пробирок (объемом 0,2 или 0,5 мл), соответствующее числу анализируемых образцов, промаркировать их и расположить в штативе.

3) Достать из набора пробирку «П» и установить ее в штатив.

4) «В1», «В2», «В3», «В4», «В5», «В6», «АБ» и «П» готовы к использованию.

5) Для каждого образца приготовить рабочую смесь по протоколу:

«АБ» (амплификационный буфер)	127 мкл
«П» (ДНК-полимераза)	3,3 мкл
<u>Объединенные продукты ПЦР1</u>	<u>10 мкл</u>
Общий объем:	140,3 мкл.

Перемешать смеси на вортке и собрать капли коротким центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 секунд при 2400 об/мин.

6) Для каждого анализируемого образца приготовить по 6 пробирок, подходящих для используемого типа амплификатора, и промаркировать их от 1 до 6. Аликвотировать каждую рабочую смесь в 6 пробирок по 22 мкл.

7) Добавить по 3 мкл каждой смеси праймеров «В1»-«В6» в соответствующие пробирки с рабочими смесями. Перемешать готовые смеси на вортке и удалить со стенок пробирок капли центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 секунд при 2400 об/мин.

Примечание: После приготовления смесей убрать все исходные компоненты в морозильную камеру на -18...-22 °С.

8) Поместить пробирки в амплификатор и провести реакцию по следующей программе:

Денатурация	+95 °С – 1 мин
40 циклов	{ +96 °С – 2 с
	{ +55 °С – 10 с
	{ +68 °С – 5 с

7.2. Гибридизация

7.2.1. Не менее чем за час перед гибридизацией разморозить блокирующий буфер («ББ») и гибридизационный буфер («ГБ»). Включить водяную баню или суховоздушный термостат на +50 °С (водяная баня должна быть наполнена водой на 5 см выше площадки для размещения стакана).

Поместить в водяную баню емкость Хеллендаля с 70 мл «ББ» и стакан объемом 50 мл с 40 мл воды.

7.2.2. Поместить флакон с «ГБ» в водяную баню (термостат) и выдержать 10 минут при +50 °С до полного растворения осадка.

7.2.3. Нанести маркировку на гибридизационные камеры и этикетки биочипов водостойким маркером.

7.2.4. Поместить биочип в «ББ» в емкость Хеллендаля при +50 °С на 10 минут. На всех последующих этапах работы с биочипом не допускать его высыхания!

7.2.5. Внести 1 мл «ГБ» в пробирку типа «эппендорф» на 1,5 мл.

7.2.6. Внести в неё указанное ниже количество меченых зондов из смесей ПЦР2 (B1-B6):

- B1 – 7 мкл,
- B2 – 10 мкл,
- B3 – 4 мкл,
- B4 – 21 мкл,
- B5 – 17 мкл,
- B6 – 17 мкл.

Перемешать смесь на вортексе и собрать капли коротким центрифугированием.

7.2.7. Перенести гибридизационный буфер с зондами в гибридизационную камеру.

7.2.8. Извлечь биочип из блокирующего буфера, вставить его в гибридизационную камеру так, чтобы маркировка биочипа находилась наверху и лицевой стороной к расширению камеры. Проконтролировать, чтобы биочип был покрыт буфером не менее чем на 4 см. Поместить камеру с биочипом в водяную баню (термостат) и инкубировать при +50 °С в течение 90 минут. Камеры с биочипами должны быть расположены вертикально и на 2/3 находиться в воде. В качестве держателя рекомендуется использовать химический стакан объемом 50 мл с 40 мл воды.

7.2.9. После окончания гибридизации извлечь биочип из камеры и промыть в ёмкости с дистиллированной водой 1 минуту при комнатной температуре, затем высушить центрифугированием.

7.3. Высушивание биочипа. Для удаления остатков жидкости с поверхности биочипа перед сканированием и предотвращения контаминации рабочей поверхности (поверхности биочипа, на которую нанесены мишени) продуктами амплификации рекомендуется открутить биочипы в центрифуге (Дастан ОПн-3.02 или ELMi CM-6), поместив по 2 стекла в фалькон 40 мл таким образом, чтобы рабочие поверхности биочипов были направлены друг против друга.

Примечание: В случае использования гибридизационной станции «Тесап» следуйте инструкции производителя.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Сканирование.

–«Муковисцидоз-БиоЧип» совместим со всеми сканерами для чипов (ScanArray G_x (PerkinElmer), MArS (Ditabis) и PowerScanner (Tecan)) стандартного размера 75х25х1 мм. Настройки сканера (мощность лазера, коэффициент усиления, разрешение) устанавливаются индивидуально. Биочип вставляется в сканер рабочей поверхностью вверх и маркировкой наружу.

8.2. Результат сканирования биочипа сохраняется в формате TIF.

Внимание! Не следует касаться рабочей области биочипов, поскольку это может привести к повреждению их поверхности. Биочипы следует брать в перчатках без обсыпки и держать за края в области маркировки. Вся работа с биочипами должна проводиться в месте, защищенном от пыли.

9. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для снижения вероятности ошибки поле анализа представлено на биочипе в четырех повторях.

Результаты теста могут быть проанализированы визуально или с помощью программы MB25-СКАН. Схема биочипа «Муковисцидоз-БиоЧип» приведена на Рисунке 3. Все мишени нанесены в вертикальных дублях. Зоны А-Е (1-5) представляют собой мишени, соответствующие дикому типу гена по исследуемым мутациям. Зоны F-J (1-5) соответствуют мутантным аллелям. Зона К (1-5) является маркером для позиционирования координатной маски (двумерной координатной сетки, отражающей положение точек на графическом изображении, полученном при сканировании).

Критерием правильности работы набора реагентов «Муковисцидоз-БиоЧип» является наличие сигналов в поле дикого типа, что является контролем прохождения всех этапов реакции. Все сигналы в поле дикого типа должны присутствовать для всех образцов ДНК, за исключением случаев анализа образцов ДНК мутантной гомозиготы. В этом случае в мутантном поле должны светиться точки, отсутствующие в поле дикого типа.

При визуальном анализе должны быть учтены следующие условия:

1) Вывод о наличии мутации основывается на сравнении интенсивности сигналов топографически сходных точек в полях А-Е (1-5) и F-J (1-5). Например, А1 и F1, А2 и F2 и т.п. Положительным сигналом в «мутантном поле» считается сигнал, интенсивность которого равноценна или лишь незначительно отличается от интенсивности топографически соответствующей точки в поле «дикого типа».

Возможны следующие три варианта результатов (на примере полей А1 и F1):

1. Присутствие сигнала в А1 и отсутствие в F1. Вывод: гомозигота - дикий тип по мутации del ex 2,3.

2. Присутствие сигналов и в А1 и в F1. Вывод: гетерозигота по мутации del ex 2,3.

3. Отсутствие сигнала в А1 и присутствие в F1. Вывод: гомозигота по данной мутации.

В случае дикого типа по всем анализируемым мутациям все точки в зоне А-Е (1-5) должны давать положительные сигналы. В случае наличия мутаций должно появиться не более двух точек в зоне F-J (1-5). В противном случае анализ рекомендуется повторить.

2) Если в поле дикого типа отсутствует более одной пары точек, то результаты анализа считаются недействительными.

В этом случае рекомендуется повторение ПЦР.

Исключение составляют следующие ситуации:

- отсутствие А1 и А2 в случае присутствия сигнала F1;
- отсутствие А1 и А2 в случае присутствия сигнала F2;
- отсутствие D1 и D2 в случае присутствия сигнала I1;
- отсутствие D1 и D2 в случае присутствия сигнала I2;
- отсутствие В3 и В5 в случае присутствия G3;
- отсутствие В3 и В5 в случае присутствия G5.