

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от «___» _____ 2010 г.
№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института
биологии гена РАН,
академик



Ильин Ю.В.

«06» апреля 2010г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
(РТ-антиген)**

(CT-antigen, molecular diagnostics of cancer-testis antigens in biopsy samples kit)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для молекулярно-генетической диагностики раково-тестикулярных антигенов методом полимеразной цепной реакции (РТ-антиген)» предназначен для качественного определения наличия матричной РНК раково-тестикулярных антигенов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биопсийном материале пациентов, клеточных линиях и первичных клеточных культурах, полученных из опухолевых тканей пациентов, с детекцией продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Набор рассчитан на проведение 240 реакций (10 образцов), включая контрольные образцы. Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В процессе онкогенеза превращение нормальной клетки в злокачественную происходит в несколько этапов. На этих этапах в генетическом аппарате клетки накапливаются мутации, в результате которых происходит изменение профиля экспрессии генов. На данный момент охарактеризован целый ряд генов, изменения в работе которых, свидетельствуют о трансформации клетки в злокачественную. В результате экспрессии гена в клетке появляются молекулы матричной РНК, кодирующие белок или антиген, который является продуктом данного гена. В настоящее время одними из наиболее изученных опухолеассоциированных антигенов являются раково-тестикулярные антигены (РТА). Применение специального фермента – обратной транскриптазы, позволяет синтезировать однонитевую ДНК (комплиментарную ДНК – кДНК) на основе матричной РНК. В свою очередь, кДНК служит матрицей для полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР основана на способности фермента Таq-полимеразы амплифицировать конкретную последовательность ДНК до 10^8 раз. При амплификации выбранного участка ДНК с помощью ПЦР используют специальные олигонуклеотидные зонды - праймеры, комплементарные концам амплифицируемого фрагмента. Праймеры, входящие в данный набор, позволяют достоверно фиксировать наличие 10 видов матричной РНК в анализируемом образце и сделать заключение об экспрессии 9 РТА в клетках биопсийного материала пациента или в клеточных линиях (Таблица 1). РТА в норме экспрессируются клетками плаценты и семенников. Активация экспрессии этих антигенов в других тканях характерна для опухолевых новообразований. Определение профиля экспрессии РТА позволяет диагностировать онкологические заболевания различных гистологических типов на ранних стадиях, а также клинически прогнозировать течение заболевания и выбор тактики лечения.

Данный набор содержит также праймеры к гену GAPDH, позволяющие проводить качественную оценку выделенной из исследуемых образцов РНК.

Таблица 1

Название семейства генов	Обозначение праймеров в наборе	Размер амплифицируемого участка (п.н.)
GAPDH	Раствор праймеров 0 (GAP)	220
MAGE A3 (ген CT1.3)	Раствор праймеров 1 (MA3)	314
MAGE A4 (ген CT1.4)	Раствор праймеров 2 (MA4)	284
MAGE A6 (ген CT1.6)	Раствор праймеров 3 (MA6)	297
MAGE A10 (ген CT1.10)	Раствор праймеров 4 (MA10)	310
MAGE A12 (ген CT1.12)	Раствор праймеров 5 (MA12)	289
GAGE (гены CT4.2-CT4.8)	Раствор праймеров 6 (GA)	258
NY-ESO-1 (ген CT6.1)	Раствор праймеров 7 (NY)	233
LAGE-1a (ген CT6.2a)	Раствор праймеров 8 (LA)	233
BAGE (гены CT2.2, CT2.3)	Раствор праймеров 9 (BA)	186

Для визуализации результатов анализа применяется метод горизонтального электрофореза, разделяющего фрагменты ДНК в агарозном геле с бромидом этидия. В норме регистрируется отсутствие полос соответствующего размера относительно маркера молекулярного веса, а при подозрении на онкологическое заболевание может регистрироваться по одной полосе соответствующего размера согласно Таблице 1.

Исследование биопсийного и клеточного материала с помощью данного набора включает в себя следующие лабораторные этапы:

1. Выделение РНК из анализируемого материала.
2. Реакция обратной транскрипции (ОТ).
3. Оценка качества выделенной РНК.
4. Амплификация.
5. Детекция продуктов амплификации.

2.2. Состав набора

В состав набора, рассчитанного на проведение 240 исследований, входят следующие компоненты:

ПЦР-смесь	240 пробирок
ПЦР-растворитель	1 мл (3 пробирки)
Раствор праймеров 0 (GAP)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 1 (MA3)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 2 (MA4)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 3 (MA6)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 4 (MA10)	60 мкл (1 пробирка)

Раствор праймеров 5 (MA12)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 6 (GA)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 7 (NY)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 8 (LA)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 9 (BA)	60 мкл (1 пробирка)
Вода	1 мл (3 пробирки)
Положительный контрольный образец 1	60 мкл (1 пробирка)
Положительный контрольный образец 2	60 мкл (2 пробирки)

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность анализа:

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками - праймерами, гомологичными определенной конфигурации ДНК-фрагмента клетки. Специфичность обнаружения определенных ДНК-фрагментов 99 %.

Чувствительность анализа:

10^5 копий ДНК-матрицы.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2. Мерами предосторожности является соблюдение требований «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Для проведения исследований необходимо следующее оборудование и материалы, не входящие в комплектацию набора:

-Ламинарный бокс.

-Настольная центрифуга для пробирок на 1,5 мл на 10 - 14 тыс. об/мин.

- Сухой термостат, способный поддерживать температуру в диапазоне от 37°C до 100°C.
- Вортекс для встряхивания пробирок.
- Дозаторы (автоматические лабораторные пипетки) на 20, 200, 1000 мкл.
- Прибор для амплификации ДНК. Рекомендуется использовать PTC-220 DNA Engine Dyad Cyclor BIO-RAD (США).
- Камера для горизонтального электрофореза в агарозном геле длиной не менее 10 см.
- Источник постоянного тока с напряжением не менее 200 В.
- Прибор для фотодокументации гелей.
- УФ-трансиллюминатор (254 или 302 нм).
- Спектрофотометр Nanodrop 8000 (США).
- Весы лабораторные для взвешивания реактивов.
- Ступка лабораторная фарфоровая с пестиком d=75мм или TissueLyser («Qiagen», США) (для биопсийного материала).
- Шприц и игла (0,9 мм) или QIAshredder («Qiagen», США) (для биопсийного и клеточного материала).
- Штативы для пробирок 1,5, 0,5 и 0,2 мл.
- Ножницы прямые.
- Емкость для сброса использованных наконечников.
- Наконечники для лабораторных пипеток разовые с фильтром и без фильтра на 20, 200 и 1000 мкл.
- Пробирки лабораторные на 10 мл, 50 мл, 1,5 мл, 0,5 мл и 0,2 мл.
- Перчатки медицинские одноразовые.
- 14,3 М β-меркаптоэтанол.
- Азот.
- Агароза.
- Бромид этидия.
- Вода для инъекций.

- Набор для выделения РНК «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США) или аналогичный.
- Набор для обратной транскрипции «RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase» («Fermentas», Латвия) или аналогичный.
- Ингибитор рибонуклеаз «RNasin® Ribonuclease Inhibitor» («Promega», США) или аналогичный.
- ДНКаза «RQ1 RNase-Free DNase» («Promega», США) или аналогичная.
- Маркер молекулярного веса «O'GeneRuler 50 bp DNL Ladder» («Fermentas», Латвия) или аналогичный.
- Этанол.
- Раствор трис-боратного буфера пятикратный (TBEх5).

6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используется биопсийный материал пациентов – свежезамороженные фрагменты тканей или фрагменты тканей, стабилизированные в RNA- *later* RNA Stabilization Reagent («Qiagen», США) или аналогичном стабилизационном буфере. Данный набор реагентов может также использоваться для клинических и научных исследований клеточных линий и первичных клеточных культур, полученных из опухолевых тканей пациентов. Хранение полученного материала осуществляется при следующих условиях:

- свежезамороженные образцы - при температуре -70°С;
- стабилизированные образцы – согласно инструкции к стабилизационному буферу.

Срок хранения биопсийного материала – не более 1 года с момента взятия пробы.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Схема проведения исследования дана в Приложении 1.

7.1. Выделение РНК

7.1.1. Процедура выделения РНК из анализируемого материала

Реагенты для выделения РНК не входят в комплектацию данного набора. Рекомендуется использовать набор «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США) или аналогичный. Выделение РНК осуществляется согласно Инструкции по применению соответствующего набора.

7.1.2. Процедура оценки количества выделенной РНК

Для получения достоверных и качественных результатов при амплификации рекомендуется провести предварительную оценку концентрации полученной РНК одним из приведенных методов.

Спектрофотометрический метод:

Оценку концентрации РНК проводят с помощью спектрофотометра Nanodrop («Thermo», США) или аналогичного. 2 – 3 мкл раствора, содержащего выделенную РНК, наносят на рабочую поверхность прибора и запускают программу анализа РНК, входящую в комплект программного обеспечения спектрофотометра. В качестве контроля рекомендуется использовать аналогичный объем буферного раствора из набора для выделения РНК, использованного на последнем этапе выделения для растворения РНК. Максимум поглощения в исследуемых образцах должен наблюдаться при длине волны 260 нм. Пригодными для работы признаются образцы РНК с концентрацией 50 - 1500 нг/мкл. В случае выявления низкой концентрации РНК необходимо повторить процедуру выделения РНК (п.7.1.1.).

Спектрофлуориметрический метод:

Оценку концентрации РНК проводят с помощью спектрофлуориметра и набора реагентов и стандартов для определения концентрации РНК. Рекомендуется использовать набор «Qubit» («Life Technologies», США) в соответствии с инструкцией производителя.

7.1.3. Процедура обработки выделенной РНК ДНКазой

Реагенты для обработки растворов выделенной РНК ДНКазой не входят в комплектацию данного набора. Для проведения данной процедуры рекомендуется использовать ДНКазу из набора «RQ1 RNase-Free DNase»

(«Promega», США) или аналогичную. Обработка ДНКазой осуществляется согласно Инструкции по применению соответствующего набора.

7.2. Реакция обратной транскрипции (ОТ)

7.2.1. Процедура реакции обратной транскрипции (ОТ)

Реагенты для проведения реакции ОТ не входят в комплектацию данного набора. Для проведения данной реакции используются реагент «RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase» («Fermentas», Латвия) или аналогичный. В качестве олигонуклеотидных затравок рекомендуется использовать набор «Random Hexamer Primer» («Fermentas», Латвия), а для ингибирования РНКаз – набор «RNasin® Ribonuclease Inhibitor» («Promega», США) или аналогичный.

Для каждого из исследуемых образцов маркируют по две пробирки вместимостью 0,5 мл каждая: «n-RT+» и «n-RT-», где n – номер анализируемого образца (1, 2, 3 и т.д.). В каждую пробирку добавляют по 0,6 – 1,5 мкг РНК в расчете на каждую пробу и далее следуют указаниям Инструкции к используемому набору. Хранение пробирок с готовой реакционной смесью осуществляется при температуре -70°C в течение 6 месяцев.

7.3. Оценка качества выделенной РНК

Контроль качества выделенной РНК и материала реакции ОТ проводят с использованием праймеров к гену GAPDH (праймеры 0 (GAP)), который экспрессируется во всех клетках человеческого организма. Размер амплифицируемого фрагмента для пары праймеров 0 (GAP) составляет 220 п.н.

7.3.1. Извлечь из холодильника за 20 – 30 мин до приготовления амплификационной смеси раствор праймеров 0 (GAP), положительный контрольный образец 1, ПЦР-растворитель и воду. Содержимое пробирок с реагентами разморозить при комнатной температуре, тщательно встряхнуть и поместить пробирки в ледяную баню, которую разместить рядом с ламинарным боксом.

7.3.2. Извлечь из холодильника готовые пробирки с ПЦР-смесью и промаркировать их в соответствии с количеством анализируемых проб маркировкой «n-0RT+» и «n-0RT-», где n – номер анализируемой пробы (1, 2, 3 и т.д.).

7.3.3. Промаркировать по 1 пробирке с ПЦР-смесью для отрицательного (маркировка «0K-») и положительного (маркировка «0K+») контрольных образцов.

7.3.4. Пробирки с реакционными смесями «n-RT+» и «n-RT-» извлечь из холодильника непосредственно перед добавлением их содержимого в амплификационную смесь. Во все маркированные пробирки добавить реагенты согласно Таблице 2.

Таблица 2

Реагент	Маркировка пробирок			
	«0K+»	«0K-»	«n-0RT+»	«n-0RT-»
ПЦР-растворитель	10 мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл
Вода	7 мкл	8 мкл	7 мкл	7 мкл
Раствор праймеров 0 (GAP)	2 мкл	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Положительный контрольный образец 1	1 мкл	-	-	-
Реакционная смесь «n-0RT+»	-	-	1 мкл	-
Реакционная смесь «n-0RT-»	-	-	-	1 мкл
Примечание: Общий объем амплификационной смеси должен составлять 20 мкл.				

7.3.5. Пробирки с амплификационной смесью поместить в блок амплификатора и провести амплификацию по следующей программе (Таблица 3):

Таблица 3

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94	2 мин	1
94	40 сек	26
55	1 мин	
72	1 мин	
72	2 мин	1

7.3.6. Провести детекцию продуктов амплификации согласно п.7.4.

7.3.7. Регистрацию результатов детекции провести согласно п.8.1. Учет результатов исследования представлен в Таблице 8.

Пример электрофореграммы экспрессии гена GAPDH приведен в Приложении 2.

7.4. Амплификация

7.4.1. Извлечь из холодильника за 20 – 30 мин до приготовления амплификационной смеси растворы праймеров к РТ-антигенам, положительный контрольный образец 2, ПЦР-растворитель и воду, содержимое пробирок с реагентами разморозить при комнатной температуре, тщательно встряхнуть и поместить пробирки в ледяную баню, которую разместить рядом с ламинарным боксом.

7.4.2. Извлечь из холодильника готовые пробирки с ПЦР-смесью и промаркировать их в соответствии с анализируемым антигеном маркировкой «n-mRT+» и «n-mRT-», где m – номер раствора праймеров к анализируемому антигену (1, 2, 3 и т.д.), n – номер анализируемого образца (1, 2, 3 и т.д.).

Пример приведен в Таблице 4.

Таблица 4

Номер раствора праймеров	Маркировка пробирок с ПЦР-смесью					
	Анализируемый образец 1		Анализируемый образец 2		Анализируемый образец n	
	«1-RT+»	«1-RT-»	«2-RT+»	«2-RT-»	«n-RT+»	«n-RT-»
1	«1-1RT+»	«1-1RT-»	«2-1RT+»	«2-1RT-»	«n-1RT+»	«n-1RT-»
2	«1-2RT+»	«1-2RT-»	«2-2RT+»	«2-2RT-»	«n-2RT+»	«n-2RT-»
3	«1-3RT+»	«1-3RT-»	«2-3RT+»	«2-3RT-»	«n-3RT+»	«n-3RT-»
m	«1-mRT+»	«1-mRT-»	«2-mRT+»	«2-mRT-»	«n-mRT+»	«n-mRT-»

7.4.3. Маркировать пробирки для отрицательного (маркировка «mK-») и положительного (маркировка «mK+» и т.д.) контрольных образцов, где m – номер соответствующего раствора праймеров (1, 2, 3 и т.д.)

7.4.4. Пробирки с продуктами реакции ОТ «n-RT+» и «n-RT-» извлечь из холодильника непосредственно перед добавлением их содержимого в амплификационную смесь. Во все маркированные пробирки добавить реагенты согласно Таблице 5.

Таблица 5

Реагент	Маркировка пробирок			
	«mK+»	«mK-»	«n-mRT+»	«n-mRT-»
ПЦР-растворитель	10 мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл
Вода	7 мкл	8 мкл	7 мкл	7 мкл
Раствор праймеров 1 или 2, или 3 и т.д.	2 мкл	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Положительный контрольный образец 2	1 мкл (*)	-	-	-
Реакционная смесь «n-0RT+»	-	-	1 мкл	-
Реакционная смесь «n-0RT-»	-	-	-	1 мкл

Примечание:
 (*) – положительный контрольный образец 2 используют без разведения при проведении 26 циклов амплификации (Таблица 6). При большем количестве циклов необходимо использовать 1 мкл соответствующего разведения положительного контрольного образца 2 для анализируемого антигена (Таблица 7).
 Общий объем амплификационной смеси должен составлять 20 мкл.

7.4.5. Амплификацию проводят по программе согласно Таблице 6:

Таблица 6

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94	2 мин	1
94	40 сек	30-37 (*)
55	1 мин	
72	1 мин	
72	2 мин	1

Примечание:

(*) - Количество циклов амплификации зависит от анализируемого антигена. Рекомендуется использовать следующее количество циклов амплификации и разведений положительного контрольного образца 2, приведенные в Таблице 7:

Таблица 7

Наименование раствора праймеров	Рекомендуемое кол-во циклов амплификации	Рекомендуемые разведения положительного контр. образца 2
1 (MA3)	34	1:100
2 (MA4)		
3 (MA6)		
4 (MA10)		
5 (MA12)	37	1:500
6 (GA)	30	1:10
7 (NY)	37	1:500
8 (LA)	30	1:10
9 BA)	34	1:100

7.5. Детекция продуктов амплификации

7.5.1. Приготовление буферного раствора для проведения электрофореза

Буферный раствор TBEх5 готовят из сухой смеси производства «Sigma» согласно инструкции. Для проведения электрофореза используют буфер TBEх1 (на 4 объема воды добавить 1 объем буферного раствора TBEх5).

7.5.2. Приготовление раствора бромида этидия концентрации 10 мг/мл

100 мг бромида этидия поместить в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавить воду для инъекций, тщательно перемешать и довести этой же водой до метки.

7.5.3. Приготовление агарозного геля концентрации 1,5 %

Собрать установку для горизонтального электрофореза и установить гребенку в камеру.

Для проведения электрофореза готовят смесь агарозного геля в концентрации 1,5 %. Для этого в мерный термостойкий стакан вместимостью 250 мл добавить 1,5 г агарозы, 100 мл буфера TBEх1 и все тщательно перемешать. Стакан поместить в водяную баню при температуре 90 - 95°C, при постоянном помешивании довести содержимое стакана до полного расплавления и после этого вынуть стакан из водяной бани. Полученный раствор агарозы должен быть прозрачным. Расплавленную агарозу охладить до температуры 60°C, добавить в нее 1,5 мкл раствора бромида этидия концентрации 10 мг/мл и тщательно перемешать содержимое стакана равномерными вращательными движениями. Расплавленную агарозу залить слоем 0,4 – 0,6 см в камеру прибора для горизонтального электрофореза. После застывания агарозы (через 25 - 35 мин) осторожно вынуть гребенку и залить буфер TBEх1 в камеру в количестве, обеспечивающем полное погружение геля.

7.5.4. Проведение электрофореза

В лунки агарозного геля внести по 5 мкл образцов в последовательности, соответствующей нумерации проб, а также контрольные образцы и мар-

кер молекулярного веса. Электрофоретическую камеру подключить к источнику питания, установить значение напряжения в 140 В и провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за процессом разделения осуществляют визуально по движению полосы красителя (ксиленцианола), которая должна пройти не менее 3 см.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Гель на подложке аккуратно перенести на стекло УФ-трансиллюминатора с длиной волны 254 нм или 302 нм.

8.2. Полученные результаты документируют фотографированием геля с использованием соответствующих светофильтров.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Учет результатов исследования проводят согласно Таблице 8.

При детекции в образце полос соответствующего размера и соблюдении всех условий, представленных в Таблице 8, полученный результат интерпретируется как положительный и выдается заключение о наличии экспрессии соответствующих раково-тестикулярных антигенов, что может использоваться для дальнейшей дифференциальной диагностики и выбора метода иммунокоррекции.

Пример электрофореграммы экспрессии РТА приведен в Приложении 3.

Таблица 8

Образцы	Результаты амплификации на электрофореграмме	Размер амплифицируемого участка (п.н.)	Название семейства генов
Оценка качества выделенной РНК:			
Положительный контрольный образец 1 (OK+)	Одна полоса	220	GAPDH
Исследуемый образец (RT+)	Одна полоса	220	GAPDH
Отрицательный контрольный образец (OK-)	Отсутствие полос размером 220 п.н.		
Исследуемый образец (RT-)	Отсутствие полос размером 220 п.н.		
Реакция амплификации:			
Положительный контрольный образец 2 (mK+)	Одна полоса	314	MAGE A3 (ген CT1.3)
		284	MAGE A4 (ген CT1.4)
		297	MAGE A6 (ген CT1.6)
		310	MAGE A10 (ген CT1.10)
		289	MAGE A12 (ген CT1.12)
		258 ¹⁾	GAGE1 (гены CT4.2 – CT4.8)
		233	NY-ESO-1 (ген CT6.1)
		233 ²⁾	LAGE-1a (ген CT6.2a)
		188 ³⁾	BAGE (гены CT2.2, CT2.3)
Отрицательный контрольный образец (mK-)	Отсутствие полос соответствующих размеров (см. выше)		
Исследуемый образец (n-mRT-)	Отсутствие полос соответствующих размеров (см. выше)		
Примечание:			
1) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 6 (GA)может детектироваться фрагмент ДНК, имеющий размер 401 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственного гена GAGE1(CT4.1).			
2) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 8 (LA)может детектироваться фрагмент ДНК, имеющий размер 462 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственного гена LAGE1b(CT6.2b).			
3) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 9 (BA)могут детектироваться фрагменты ДНК, имеющие размер 256 и 328 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственных генов BAGE5(CT2.5) и BAGE1(CT2.1).			
Сигнал должен регистрироваться в виде хорошо различимой полосы соответствующего данным праймерам размера. Если возникли сложности с регистрацией сигнала, необходимо следовать процедурам, описанным в Приложении 4.			

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре:
4°C - 2°C – ПЦР-смесь и ПЦР-растворитель;
(-20°C) – (-18°C) - вода, контрольные образцы ДНК и растворы праймеров.

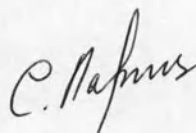
Срок годности набора – 1 год.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По всем вопросам, касающимся применения и качества данного набора, обращаться по адресу: Учреждение Российской академии наук

Институт биологии гена РАН
119334, Москва, ул.Вавилова, 34/5
Тел./ф.:4991354105, 4991359970

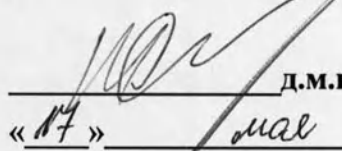
Заведующий лабораторией
генной терапии



С.С.Ларин

«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГОУ ДПО «РМАПО Росздравнадзора»

 д.м.н., профессор Долгов В.В.
«17» мая 2010 г.



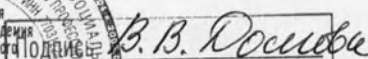
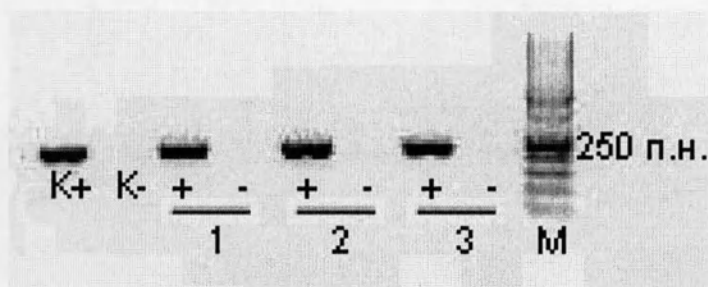

Подпись: В.В. Роснина
Удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»
Подпись: 

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ



ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА GAPDH



«K+» – положительный контрольный образец 1,

«K-» – отрицательный контрольный образец,

«1» – биопсийный материал слизистой ротовой полости здорового донора,

«2» – биопсийный материал рака молочной железы человека,

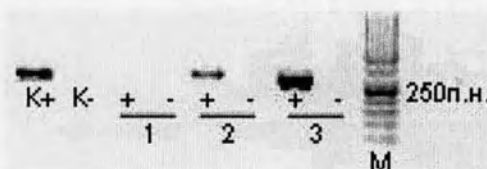
«3» – клеточная линия меланомы человека,

Полосы: «+» – «RT+»,

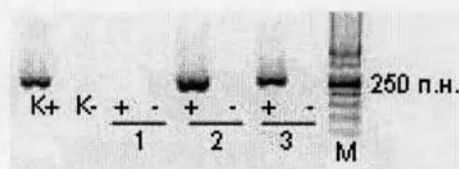
«-» – «RT-»,

M – маркер молекулярного веса ДНК «O'Gene Ruler 50bp DNA Ladder».

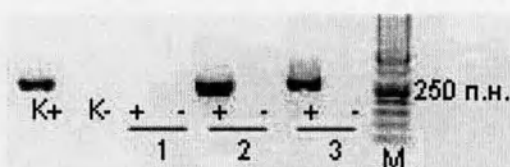
ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА ЭКСПРЕССИИ РАКОВО- ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ



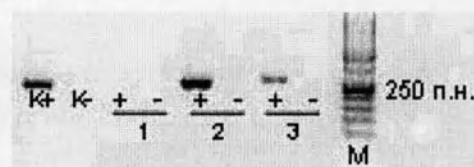
Праймер 1 (MA3)



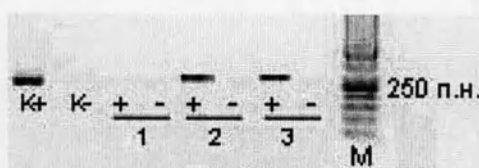
Праймер 2 (MA4)



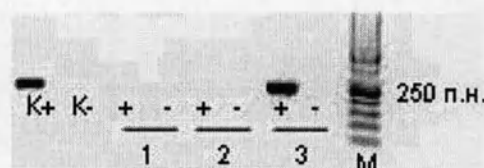
Праймер 3 (MA6)



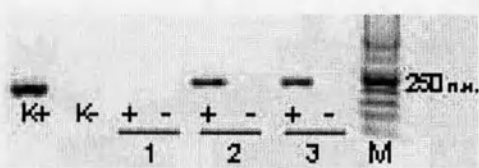
Праймер 4 (MA10)



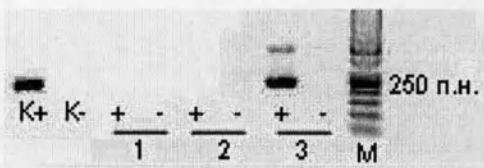
Праймер 5 (MA12)



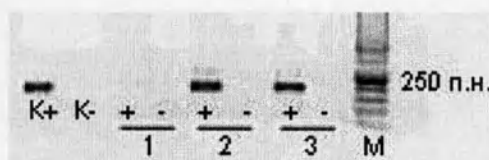
Праймер 6 (GA)



Праймер 7 (NY)



Праймер 8 (LA)



Праймер 9 (BA)

«K+» – положительный контрольный образец 2,

«K-» – отрицательный контрольный образец,

«1» – биопсийный материал слизистой ротовой полости здорового донора,

«2» – биопсийный материал рака молочной железы человека,

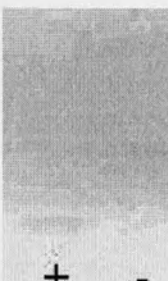
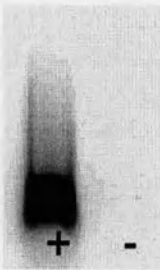
«3» – клеточная линия меланомы человека,

Полосы: «+» – «RT+»,

«-» – «RT-»,

M – маркер молекулярного веса ДНК «O'Gene Ruler 50bp DNA Ladder».

ВАРИАНТЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
Продукт ПЦР не регистрируется в виде хорошо различимого сигнала – полосы. 	Отсутствие какого-либо компонента реакции или его порча в процессе хранения.	1. Проверить правильность приготовления растворов и реакционных смесей. 2. Проверить работу реагентов в контрольной ПЦР с использованием контрольных образцов. 3. Проверить условия хранения реагентов набора.
	Недостаточное число циклов ПЦР.	1. Увеличить число циклов ПЦР, добавляя по 4 цикла каждый раз.
	Слишком низкая или высокая концентрация РНК-матрицы.	1. Сделать серию последовательных разведений матрицы.
	Плохое качество РНК	1. Проверить качество анализируемого материала. 2. Повторить процедуру выделения РНК.
Продукт ПЦР выглядит как много полос или шумер при анализе на агарозном геле. 	Избыточное количество циклов ПЦР.	1. Повторить реакцию, контролируя появление ПЦР-продукта при меньшем числе циклов.
	Контаминация посторонней ДНК.	1. Контролировать уровень контаминации компонентов ПЦР, приборов и помещения с помощью негативного контроля. При обнаружении контаминации провести процедуру деонтаминации согласно требованиям нормативных документов.
	Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы.	1. Сделать серию последовательных разведений матрицы.
Появление сигнала в пробах «RT-».	Контаминация исследуемых образцов остаточной геномной ДНК.	1. Повторить процедуру обработки выделенной РНК ДНКазой (п.7.1.3.).
	Контаминация реактивов, оборудования и помещения продуктами ПЦР.	1. Провести процедуру деонтаминации.

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от «__» _____ 2010 г.
№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института
биологии гена РАН,
академик



Ильин Ю.В.

«__» _____ 2010г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
(РТ-антиген)**

(CT-antigen, molecular diagnostics of cancer-testis antigens in biopsy samples kit)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для молекулярно-генетической диагностики раково-тестикулярных антигенов методом полимеразной цепной реакции (РТ-антиген)» предназначен для качественного определения наличия матричной РНК раково-тестикулярных антигенов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биопсийном материале пациентов, клеточных линиях и первичных клеточных культурах, полученных из опухолевых тканей пациентов, с детекцией продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Набор рассчитан на проведение 240 реакций (10 образцов), включая контрольные образцы. Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В процессе онкогенеза превращение нормальной клетки в злокачественную происходит в несколько этапов. На этих этапах в генетическом аппарате клетки накапливаются мутации, в результате которых происходит изменение профиля экспрессии генов. На данный момент охарактеризован целый ряд генов, изменения в работе которых, свидетельствуют о трансформации клетки в злокачественную. В результате экспрессии гена в клетке появляются молекулы матричной РНК, кодирующие белок или антиген, который является продуктом данного гена. В настоящее время одними из наиболее изученных опухолеассоциированных антигенов являются раково-тестикулярные антигены (РТА). Применение специального фермента – обратной транскриптазы, позволяет синтезировать однонитевую ДНК (комплиментарную ДНК – кДНК) на основе матричной РНК. В свою очередь, кДНК служит матрицей для полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР основана на способности фермента Таq-полимеразы амплифицировать конкретную последовательность ДНК до 10^8 раз. При амплификации выбранного участка ДНК с помощью ПЦР используют специальные олигонуклеотидные зонды - праймеры, комплементарные концам амплифицируемого фрагмента. Праймеры, входящие в данный набор, позволяют достоверно фиксировать наличие 10 видов матричной РНК в анализируемом образце и сделать заключение об экспрессии 9 РТА в клетках биопсийного материала пациента или в клеточных линиях (Таблица 1). РТА в норме экспрессируются клетками плаценты и семенников. Активация экспрессии этих антигенов в других тканях характерна для опухолевых новообразований. Определение профиля экспрессии РТА позволяет диагностировать онкологические заболевания различных гистологических типов на ранних стадиях, а также клинически прогнозировать течение заболевания и выбор тактики лечения.

Данный набор содержит также праймеры к гену GAPDH, позволяющие проводить качественную оценку выделенной из исследуемых образцов РНК.

Таблица 1

Название семейства генов	Обозначение праймеров в наборе	Размер амплифицируемого участка (п.н.)
GAPDH	Раствор праймеров 0 (GAP)	220
MAGE A3 (ген CT1.3)	Раствор праймеров 1 (MA3)	314
MAGE A4 (ген CT1.4)	Раствор праймеров 2 (MA4)	284
MAGE A6 (ген CT1.6)	Раствор праймеров 3 (MA6)	297
MAGE A10 (ген CT1.10)	Раствор праймеров 4 (MA10)	310
MAGE A12 (ген CT1.12)	Раствор праймеров 5 (MA12)	289
GAGE (гены CT4.2-CT4.8)	Раствор праймеров 6 (GA)	258
NY-ESO-1 (ген CT6.1)	Раствор праймеров 7 (NY)	233
LAGE-1a (ген CT6.2a)	Раствор праймеров 8 (LA)	233
BAGE (гены CT2.2, CT2.3)	Раствор праймеров 9 (BA)	186

Для визуализации результатов анализа применяется метод горизонтального электрофореза, разделяющего фрагменты ДНК в агарозном геле с бромидом этидия. В норме регистрируется отсутствие полос соответствующего размера относительно маркера молекулярного веса, а при подозрении на онкологическое заболевание может регистрироваться по одной полосе соответствующего размера согласно Таблице 1.

Исследование биопсийного и клеточного материала с помощью данного набора включает в себя следующие лабораторные этапы:

1. Выделение РНК из анализируемого материала.
2. Реакция обратной транскрипции (ОТ).
3. Оценка качества выделенной РНК.
4. Амплификация.
5. Детекция продуктов амплификации.

2.2. Состав набора

В состав набора, рассчитанного на проведение 240 исследований, входят следующие компоненты:

ПЦР-смесь	240 пробирок
ПЦР-растворитель	1 мл (3 пробирки)
Раствор праймеров 0 (GAP)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 1 (MA3)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 2 (MA4)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 3 (MA6)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 4 (MA10)	60 мкл (1 пробирка)

Раствор праймеров 5 (MA12)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 6 (GA)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 7 (NY)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 8 (LA)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 9 (BA)	60 мкл (1 пробирка)
Вода	1 мл (3 пробирки)
Положительный контрольный образец 1	60 мкл (1 пробирка)
Положительный контрольный образец 2	60 мкл (2 пробирки)

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность анализа:

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками - праймерами, гомологичными определенной конфигурации ДНК-фрагмента клетки. Специфичность обнаружения определенных ДНК-фрагментов 99 %.

Чувствительность анализа:

10^5 копий ДНК-матрицы.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2. Мерами предосторожности является соблюдение требований «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Для проведения исследований необходимо следующее оборудование и материалы, не входящие в комплектацию набора:

-Ламинарный бокс.

-Настольная центрифуга для пробирок на 1,5 мл на 10 - 14 тыс. об/мин.

- Сухой термостат, способный поддерживать температуру в диапазоне от 37°C до 100°C.
- Вортекс для встряхивания пробирок.
- Дозаторы (автоматические лабораторные пипетки) на 20, 200, 1000 мкл.
- Прибор для амплификации ДНК. Рекомендуется использовать PTC-220 DNA Engine Dyad Cyclor BIO-RAD (США).
- Камера для горизонтального электрофореза в агарозном геле длиной не менее 10 см.
- Источник постоянного тока с напряжением не менее 200 В.
- Прибор для фотодокументации гелей.
- УФ-трансиллюминатор (254 или 302 нм).
- Спектрофотометр Nanodrop 8000 (США).
- Весы лабораторные для взвешивания реактивов.
- Ступка лабораторная фарфоровая с пестиком d=75мм или TissueLyser («Qiagen», США) (для биопсийного материала).
- Шприц и игла (0,9 мм) или QIAshredder («Qiagen», США) (для биопсийного и клеточного материала).
- Штативы для пробирок 1,5, 0,5 и 0,2 мл.
- Ножницы прямые.
- Емкость для сброса использованных наконечников.
- Наконечники для лабораторных пипеток разовые с фильтром и без фильтра на 20, 200 и 1000 мкл.
- Пробирки лабораторные на 10 мл, 50 мл, 1,5 мл, 0,5 мл и 0,2 мл.
- Перчатки медицинские одноразовые.
- 14,3 М β-меркаптоэтанол.
- Азот.
- Агароза.
- Бромид этидия.
- Вода для инъекций.

- Набор для выделения РНК «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США) или аналогичный.
- Набор для обратной транскрипции «RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase» («Fermentas», Латвия) или аналогичный.
- Ингибитор рибонуклеаз «RNasin® Ribonuclease Inhibitor» («Promega», США) или аналогичный.
- ДНКаза «RQ1 RNase-Free DNase» («Promega», США) или аналогичная.
- Маркер молекулярного веса «O'GeneRuler 50 bp DNL Ladder» («Fermentas», Латвия) или аналогичный.
- Этанол.
- Раствор трис-боратного буфера пятикратный (TBEx5).

6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используется биопсийный материал пациентов – свежезамороженные фрагменты тканей или фрагменты тканей, стабилизированные в RNA- *later* RNA Stabilization Reagent («Qiagen», США) или аналогичном стабилизационном буфере. Данный набор реагентов может также использоваться для клинических и научных исследований клеточных линий и первичных клеточных культур, полученных из опухолевых тканей пациентов. Хранение полученного материала осуществляется при следующих условиях:

- свежезамороженные образцы - при температуре -70°C;
- стабилизированные образцы – согласно инструкции к стабилизационному буферу.

Срок хранения биопсийного материала – не более 1 года с момента взятия пробы.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Схема проведения исследования дана в Приложении 1.

7.1. Выделение РНК

7.1.1. Процедура выделения РНК из анализируемого материала

Реагенты для выделения РНК не входят в комплектацию данного набора. Рекомендуется использовать набор «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США) или аналогичный. Выделение РНК осуществляется согласно Инструкции по применению соответствующего набора.

7.1.2. Процедура оценки количества выделенной РНК

Для получения достоверных и качественных результатов при амплификации рекомендуется провести предварительную оценку концентрации полученной РНК одним из приведенных методов.

Спектрофотометрический метод:

Оценку концентрации РНК проводят с помощью спектрофотометра Nanodrop («Thermo», США) или аналогичного. 2 – 3 мкл раствора, содержащего выделенную РНК, наносят на рабочую поверхность прибора и запускают программу анализа РНК, входящую в комплект программного обеспечения спектрофотометра. В качестве контроля рекомендуется использовать аналогичный объем буферного раствора из набора для выделения РНК, использованного на последнем этапе выделения для растворения РНК. Максимум поглощения в исследуемых образцах должен наблюдаться при длине волны 260 нм. Пригодными для работы признаются образцы РНК с концентрацией 50 - 1500 нг/мкл. В случае выявления низкой концентрации РНК необходимо повторить процедуру выделения РНК (п.7.1.1.).

Спектрофлуориметрический метод:

Оценку концентрации РНК проводят с помощью спектрофлуориметра и набора реагентов и стандартов для определения концентрации РНК. Рекомендуется использовать набор «Qubit» («Life Technologies», США) в соответствии с инструкцией производителя.

7.1.3. Процедура обработки выделенной РНК ДНКазой

Реагенты для обработки растворов выделенной РНК ДНКазой не входят в комплектацию данного набора. Для проведения данной процедуры рекомендуется использовать ДНКазу из набора «RQ1 RNase-Free DNase»

(«Promega», США) или аналогичную. Обработка ДНКазой осуществляется согласно Инструкции по применению соответствующего набора.

7.2. Реакция обратной транскрипции (ОТ)

7.2.1. Процедура реакции обратной транскрипции (ОТ)

Реагенты для проведения реакции ОТ не входят в комплектацию данного набора. Для проведения данной реакции используются реагент «RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase» («Fermentas», Латвия) или аналогичный. В качестве олигонуклеотидных затравок рекомендуется использовать набор «Random Hexamer Primer» («Fermentas», Латвия), а для ингибирования РНКаз – набор «RNasin® Ribonuclease Inhibitor» («Promega», США) или аналогичный.

Для каждого из исследуемых образцов маркируют по две пробирки вместимостью 0,5 мл каждая: «n-RT+» и «n-RT-», где n – номер анализируемого образца (1, 2, 3 и т.д.). В каждую пробирку добавляют по 0,6 – 1,5 мкг РНК в расчете на каждую пробу и далее следуют указаниям Инструкции к используемому набору. Хранение пробирок с готовой реакционной смесью осуществляется при температуре -70°C в течение 6 месяцев.

7.3. Оценка качества выделенной РНК

Контроль качества выделенной РНК и материала реакции ОТ проводят с использованием праймеров к гену GAPDH (праймеры 0 (GAP)), который экспрессируется во всех клетках человеческого организма. Размер амплифицируемого фрагмента для пары праймеров 0 (GAP) составляет 220 п.н.

7.3.1. Извлечь из холодильника за 20 – 30 мин до приготовления амплификационной смеси раствор праймеров 0 (GAP), положительный контрольный образец 1, ПЦР-растворитель и воду. Содержимое пробирок с реагентами разморозить при комнатной температуре, тщательно встряхнуть и поместить пробирки в ледяную баню, которую разместить рядом с ламинарным боксом.

7.3.2. Извлечь из холодильника готовые пробирки с ПЦР-смесью и промаркировать их в соответствии с количеством анализируемых проб маркировкой «n-0RT+» и «n-0RT-», где n – номер анализируемой пробы (1, 2, 3 и т.д.).

7.3.3. Промаркировать по 1 пробирке с ПЦР-смесью для отрицательного (маркировка «0К-») и положительного (маркировка «0К+») контрольных образцов.

7.3.4. Пробирки с реакционными смесями «n-RT+» и «n-RT-» извлечь из холодильника непосредственно перед добавлением их содержимого в амплификационную смесь. Во все маркированные пробирки добавить реагенты согласно Таблице 2.

Таблица 2

Реагент	Маркировка пробирок			
	«0К+»	«0К-»	«n-0RT+»	«n-0RT-»
ПЦР-растворитель	10 мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл
Вода	7 мкл	8 мкл	7 мкл	7 мкл
Раствор праймеров 0 (GAP)	2 мкл	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Положительный контрольный образец 1	1 мкл	-	-	-
Реакционная смесь «n-0RT+»	-	-	1 мкл	-
Реакционная смесь «n-0RT-»	-	-	-	1 мкл
Примечание: Общий объем амплификационной смеси должен составлять 20 мкл.				

7.3.5. Пробирки с амплификационной смесью поместить в блок амплификатора и провести амплификацию по следующей программе (Таблица 3):

Таблица 3

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94	2 мин	1
94	40 сек	26
55	1 мин	
72	1 мин	
72	2 мин	1

7.3.6. Провести детекцию продуктов амплификации согласно п.7.4.

7.3.7. Регистрацию результатов детекции провести согласно п.8.1. Учет результатов исследования представлен в Таблице 8.

Пример электрофореграммы экспрессии гена GAPDH приведен в Приложении 2.

7.4. Амплификация

7.4.1. Извлечь из холодильника за 20 – 30 мин до приготовления амплификационной смеси растворы праймеров к РТ-антигенам, положительный контрольный образец 2, ПЦР-растворитель и воду, содержимое пробирок с реагентами разморозить при комнатной температуре, тщательно встряхнуть и поместить пробирки в ледяную баню, которую разместить рядом с ламинарным боксом.

7.4.2. Извлечь из холодильника готовые пробирки с ПЦР-смесью и промаркировать их в соответствии с анализируемым антигеном маркировкой «n-mRT+» и «n-mRT-», где m – номер раствора праймеров к анализируемому антигену (1, 2, 3 и т.д.), n – номер анализируемого образца (1, 2, 3 и т.д.). Пример приведен в Таблице 4.

Таблица 4

Номер раствора праймеров	Маркировка пробирок с ПЦР-смесью					
	Анализируемый образец 1		Анализируемый образец 2		Анализируемый образец n	
	«1-RT+»	«1-RT-»	«2-RT+»	«2-RT-»	«n-RT+»	«n-RT-»
1	«1-1RT+»	«1-1RT+»	«2-1RT+»	«2-2RT+»	«n-1RT+»	«n-1RT+»
2	«1-2RT+»	«1-2RT+»	«2-2RT+»	«2-2RT+»	«n-2RT+»	«n-2RT+»
3	«1-3RT+»	«1-3RT+»	«2-3RT+»	«2-3RT+»	«n-3RT+»	«n-3RT+»
m	«1-mRT+»	«1-mRT+»	«2-mRT+»	«2-mRT+»	«n-mRT+»	«n-mRT+»

7.4.3. Маркировать пробирки для отрицательного (маркировка «mK-») и положительного (маркировка «mK+» и т.д.) контрольных образцов, где m – номер соответствующего раствора праймеров (1, 2, 3 и т.д.)

7.4.4. Пробирки с продуктами реакции ОТ «n-RT+» и «n-RT-» извлечь из холодильника непосредственно перед добавлением их содержимого в амплификационную смесь. Во все маркированные пробирки добавить реагенты согласно Таблице 5.

Таблица 5

Реагент	Маркировка пробирок			
	«mK+»	«mK-»	«n-mRT+»	«n-mRT-»
ПЦР-растворитель	10 мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл
Вода	7 мкл	8 мкл	7 мкл	7 мкл
Раствор праймеров 1 или 2, или 3 и т.д.	2 мкл	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Положительный контрольный образ- ец 2	1 мкл (*)	-	-	-
Реакционная смесь «n-0RT+»	-	-	1 мкл	-
Реакционная смесь «n-0RT-»	-	-	-	1 мкл

Примечание:
 (*) – положительный контрольный образец 2 используют без разведения при проведении 26 циклов амплификации (Таблица 6). При большем количестве циклов необходимо использовать 1 мкл соответствующего разведения положительного контрольного образца 2 для анализируемого антигена (Таблица 7).
 Общий объем амплификационной смеси должен составлять 20 мкл.

7.4.5. Амплификацию проводят по программе согласно Таблице 6:

Таблица 6

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94	2 мин	1
94	40 сек	30-37 (*)
55	1 мин	
72	1 мин	
72	2 мин	1

Примечание:

(*) - Количество циклов амплификации зависит от анализируемого антигена. Рекомендуется использовать следующее количество циклов амплификации и разведений положительного контрольного образца 2, приведенные в Таблице 7:

Таблица 7

Наименование рас- твор праймеров	Рекомендуемое кол-во циклов амплификации	Рекомендуемые разведения поло- жительного контр. образца 2
1 (MA3)	34	1:100
2 (MA4)		
3 (MA6)		
4 (MA10)		
5 (MA12)	37	1:500
6 (GA)	30	1:10
7 (NY)	37	1:500
8 (LA)	30	1:10
9 BA)	34	1:100

7.5. Детекция продуктов амплификации

7.5.1. Приготовление буферного раствора для проведения электрофореза

Буферный раствор TBE_x5 готовят из сухой смеси производства «Sigma» согласно инструкции. Для проведения электрофореза используют буфер TBE_x1 (на 4 объема воды добавить 1 объем буферного раствора TBE_x5).

7.5.2. Приготовление раствора бромида этидия концентрации 10 мг/мл

100 мг бромида этидия поместить в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавить воду для инъекций, тщательно перемешать и довести этой же водой до метки.

7.5.3. Приготовление агарозного геля концентрации 1,5 %

Собрать установку для горизонтального электрофореза и установить гребенку в камеру.

Для проведения электрофореза готовят смесь агарозного геля в концентрации 1,5 %. Для этого в мерный термостойкий стакан вместимостью 250 мл добавить 1,5 г агарозы, 100 мл буфера TBE_x1 и все тщательно перемешать. Стакан поместить в водяную баню при температуре 90 - 95°C, при постоянном помешивании довести содержимое стакана до полного расплавления и после этого вынуть стакан из водяной бани. Полученный раствор агарозы должен быть прозрачным. Расплавленную агарозу охладить до температуры 60°C, добавить в нее 1,5 мкл раствора бромида этидия концентрации 10 мг/мл и тщательно перемешать содержимое стакана равномерными вращательными движениями. Расплавленную агарозу залить слоем 0,4 – 0,6 см в камеру прибора для горизонтального электрофореза. После застывания агарозы (через 25 - 35 мин) осторожно вынуть гребенку и залить буфер TBE_x1 в камеру в количестве, обеспечивающем полное погружение геля.

7.5.4. Проведение электрофореза

В лунки агарозного геля внести по 5 мкл образцов в последовательности, соответствующей нумерации проб, а также контрольные образцы и мар-

кер молекулярного веса. Электрофоретическую камеру подключить к источнику питания, установить значение напряжения в 140 В и провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за процессом разделения осуществляют визуально по движению полосы красителя (ксиленцианола), которая должна пройти не менее 3 см.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Гель на подложке аккуратно перенести на стекло УФ-трансиллюминатора с длиной волны 254 нм или 302 нм.

8.2. Полученные результаты документируют фотографированием геля с использованием соответствующих светофильтров.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Учет результатов исследования проводят согласно Таблице 8.

При детекции в образце полос соответствующего размера и соблюдении всех условий, представленных в Таблице 8, полученный результат интерпретируется как положительный и выдается заключение о наличии экспрессии соответствующих раково-тестикулярных антигенов, что может использоваться для дальнейшей дифференциальной диагностики и выбора метода иммунокоррекции.

Пример электрофореграммы экспрессии РТА приведен в Приложении 3.

Таблица 8

Образцы	Результаты амплификации на электрофореграмме	Размер амплифицируемого участка (п.н.)	Название семейства генов
Оценка качества выделенной РНК:			
Положительный контрольный образец 1 (OK+)	Одна полоса	220	GAPDH
Исследуемый образец (RT+)	Одна полоса	220	GAPDH
Отрицательный контрольный образец (OK-)	Отсутствие полос размером 220 п.н.		
Исследуемый образец (RT-)	Отсутствие полос размером 220 п.н.		
Реакция амплификации:			
Положительный контрольный образец 2 (mK+)	Одна полоса	314	MAGE A3 (ген CT1.3)
		284	MAGE A4 (ген CT1.4)
		297	MAGE A6 (ген CT1.6)
		310	MAGE A10 (ген CT1.10)
		289	MAGE A12 (ген CT1.12)
		258 ¹⁾	GAGE1 (гены CT4.2 – CT4.8)
		233	NY-ESO-1 (ген CT6.1)
		233 ²⁾	LAGE-1a (ген CT6.2a)
		186 ³⁾	BAGE (гены CT2.2, CT2.3)
Отрицательный контрольный образец (mK-)	Отсутствие полос соответствующих размеров (см. выше)		
Исследуемый образец (n-mRT-)	Отсутствие полос соответствующих размеров (см. выше)		
Примечание:			
1) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 6 (GA)может детектироваться фрагмент ДНК, имеющий размер 401 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственного гена GAGE1(CT4.1).			
2) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 8 (LA)может детектироваться фрагмент ДНК, имеющий размер 462 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственного гена LAGE1b(CT6.2b).			
3) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 9 (BA)могут детектироваться фрагменты ДНК, имеющие размер 256 и 328 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственных генов BAGE5(CT2.5) и BAGE1(CT2.1).			
Сигнал должен регистрироваться в виде хорошо различимой полосы соответствующего данным праймерам размера. Если возникли сложности с регистрацией сигнала, необходимо следовать процедурам, описанным в Приложении 4.			

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре:

4°C - 2°C – ПЦР-смесь и ПЦР-растворитель;

(-20°C) – (-18°C) - вода, контрольные образцы ДНК и растворы праймеров.

Срок годности набора – 1 год.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По всем вопросам, касающимся применения и качества данного набора, обращаться по адресу: Учреждение Российской академии наук

Институт биологии гена РАН
119334, Москва, ул.Вавилова, 34/5
Тел./ф.: 4991354105, 4991359970

Руководитель отдела контроля и
обеспечения качества лекарственных
и диагностических препаратов



Полякова И.Н.

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУ «Федеральный
научно-клинический центр
детской гематологии, онкологии
и иммунологии» Росздрава,
член-корр. РАМН, профессор
Румянцев А.Г.

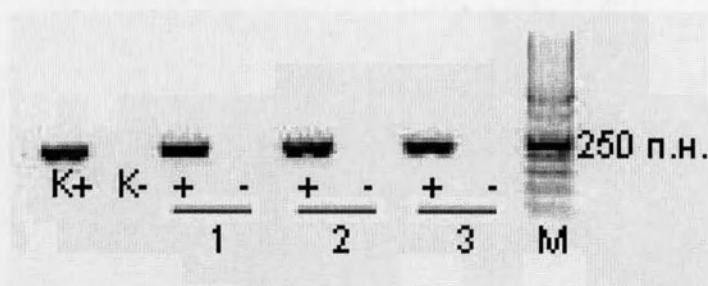
«02» сентября 20 10 г.



СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ



ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА GAPDH



«K+» – положительный контрольный образец 1,

«K-» – отрицательный контрольный образец,

«1» – биопсийный материал слизистой ротовой полости здорового донора,

«2» – биопсийный материал рака молочной железы человека,

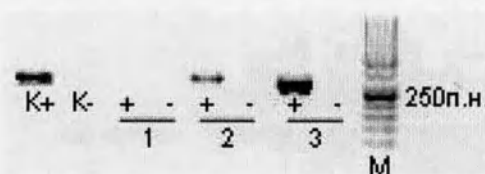
«3» – клеточная линия меланомы человека,

Полосы: «+» – «RT+»,

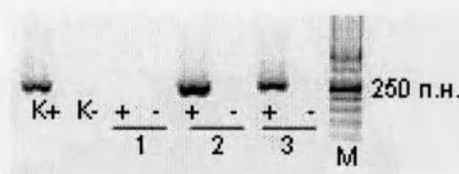
«-» – «RT-»,

M – маркер молекулярного веса ДНК «O'Gene Ruler 50bp DNA Ladder».

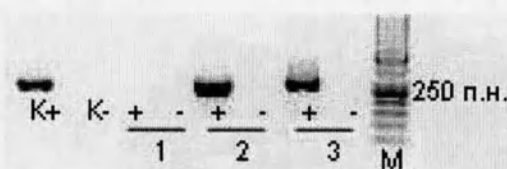
ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА ЭКСПРЕССИИ РАКОВО- ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ



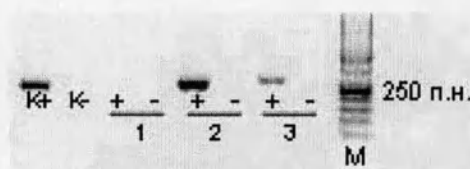
Праймер 1 (MA3)



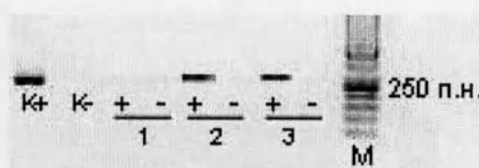
Праймер 2 (MA4)



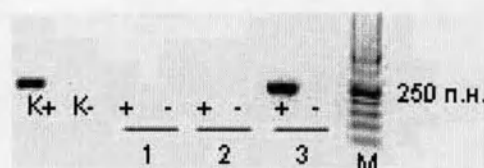
Праймер 3 (MA6)



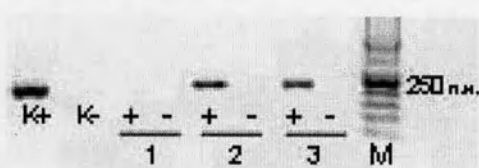
Праймер 4 (MA10)



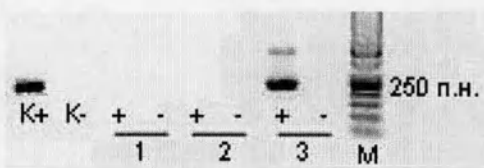
Праймер 5 (MA12)



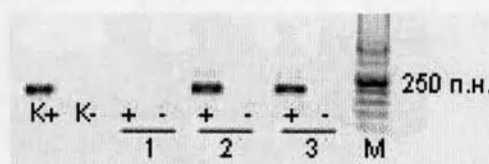
Праймер 6 (GA)



Праймер 7 (NY)



Праймер 8 (LA)



Праймер 9 (BA)

«K+» – положительный контрольный образец 2,

«K-» – отрицательный контрольный образец,

«1» – биопсийный материал слизистой ротовой полости здорового донора,

«2» – биопсийный материал рака молочной железы человека,

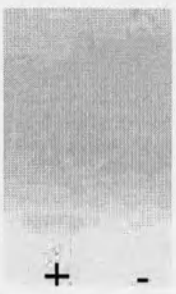
«3» – клеточная линия меланомы человека,

Полосы: «+» – «RT+»,

«-» – «RT-»,

M – маркер молекулярного веса ДНК «O'Gene Ruler 50bp DNA Ladder».

ВАРИАНТЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
Продукт ПЦР не регистрируется в виде хорошо различимого сигнала – полосы. 	Отсутствие какого-либо компонента реакции или его порча в процессе хранения.	1. Проверить правильность приготовления растворов и реакционных смесей. 2. Проверить работу реагентов в контрольной ПЦР с использованием контрольных образцов. 3. Проверить условия хранения реагентов набора.
	Недостаточное число циклов ПЦР.	1. Увеличить число циклов ПЦР, добавляя по 4 цикла каждый раз.
	Слишком низкая или высокая концентрация РНК-матрицы.	1. Сделать серию последовательных разведений матрицы.
	Плохое качество РНК	1. Проверить качество анализируемого материала. 2. Повторить процедуру выделения РНК.
Продукт ПЦР выглядит как много полос или шумер при анализе на агарозном геле. 	Избыточное количество циклов ПЦР.	1. Повторить реакцию, контролируя появление ПЦР-продукта при меньшем числе циклов.
	Контаминация постоянной ДНК.	1. Контролировать уровень контаминации компонентов ПЦР, приборов и помещения с помощью негативного контроля. При обнаружении контаминации провести процедуру деонтаминации согласно требованиям нормативных документов.
	Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы.	1. Сделать серию последовательных разведений матрицы.
Появление сигнала в пробах «RT-».	Контаминация исследуемых образцов остаточной геномной ДНК.	1. Повторить процедуру обработки выделенной РНК ДНКазой (п. 7.1.3.).
	Контаминация реактивов, оборудования и помещения продуктами ПЦР.	1. Провести процедуру деонтаминации.

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от « » 2010 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института
биологии гена РАН,
академик



Ильин Ю.В.
«06» апреля 2010г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
(РТ-антиген)**

(CT-antigen, molecular diagnostics of cancer-testis antigens in biopsy samples kit)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для молекулярно-генетической диагностики раково-тестикулярных антигенов методом полимеразной цепной реакции (РТ-антиген)» предназначен для качественного определения наличия матричной РНК раково-тестикулярных антигенов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биопсийном материале пациентов, клеточных линиях и первичных клеточных культурах, полученных из опухолевых тканей пациентов, с детекцией продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Набор рассчитан на проведение 240 реакций (10 образцов), включая контрольные образцы. Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В процессе онкогенеза превращение нормальной клетки в злокачественную происходит в несколько этапов. На этих этапах в генетическом аппарате клетки накапливаются мутации, в результате которых происходит изменение профиля экспрессии генов. На данный момент охарактеризован целый ряд генов, изменения в работе которых, свидетельствуют о трансформации клетки в злокачественную. В результате экспрессии гена в клетке появляются молекулы матричной РНК, кодирующие белок или антиген, который является продуктом данного гена. В настоящее время одними из наиболее изученных опухолеассоциированных антигенов являются раково-тестикулярные антигены (РТА). Применение специального фермента – обратной транскриптазы, позволяет синтезировать однонитевую ДНК (комплиментарную ДНК – кДНК) на основе матричной РНК. В свою очередь, кДНК служит матрицей для полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР основана на способности фермента Таq-полимеразы амплифицировать конкретную последовательность ДНК до 10^8 раз. При амплификации выбранного участка ДНК с помощью ПЦР используют специальные олигонуклеотидные зонды - праймеры, комплементарные концам амплифицируемого фрагмента. Праймеры, входящие в данный набор, позволяют достоверно фиксировать наличие 10 видов матричной РНК в анализируемом образце и сделать заключение об экспрессии 9 РТА в клетках биопсийного материала пациента или в клеточных линиях (Таблица 1). РТА в норме экспрессируются клетками плаценты и семенников. Активация экспрессии этих антигенов в других тканях характерна для опухолевых новообразований. Определение профиля экспрессии РТА позволяет диагностировать онкологические заболевания различных гистологических типов на ранних стадиях, а также клинически прогнозировать течение заболевания и выбор тактики лечения.

Данный набор содержит также праймеры к гену GAPDH, позволяющие проводить качественную оценку выделенной из исследуемых образцов РНК.

Таблица 1

Название семейства генов	Обозначение праймеров в наборе	Размер амплифицируемого участка (п.н.)
GAPDH	Раствор праймеров 0 (GAP)	220
MAGE A3 (ген CT1.3)	Раствор праймеров 1 (MA3)	314
MAGE A4 (ген CT1.4)	Раствор праймеров 2 (MA4)	284
MAGE A6 (ген CT1.6)	Раствор праймеров 3 (MA6)	297
MAGE A10 (ген CT1.10)	Раствор праймеров 4 (MA10)	310
MAGE A12 (ген CT1.12)	Раствор праймеров 5 (MA12)	289
GAGE (гены CT4.2-CT4.8)	Раствор праймеров 6 (GA)	258
NY-ESO-1 (ген CT6.1)	Раствор праймеров 7 (NY)	233
LAGE-1a (ген CT6.2a)	Раствор праймеров 8 (LA)	233
BAGE (гены CT2.2, CT2.3)	Раствор праймеров 9 (BA)	186

Для визуализации результатов анализа применяется метод горизонтального электрофореза, разделяющего фрагменты ДНК в агарозном геле с бромидом этидия. В норме регистрируется отсутствие полос соответствующего размера относительно маркера молекулярного веса, а при подозрении на онкологическое заболевание может регистрироваться по одной полосе соответствующего размера согласно Таблице 1.

Исследование биопсийного и клеточного материала с помощью данного набора включает в себя следующие лабораторные этапы:

1. Выделение РНК из анализируемого материала.
2. Реакция обратной транскрипции (ОТ).
3. Оценка качества выделенной РНК.
4. Амплификация.
5. Детекция продуктов амплификации.

2.2. Состав набора

В состав набора, рассчитанного на проведение 240 исследований, входят следующие компоненты:

ПЦР-смесь	240 пробирок
ПЦР-растворитель	1 мл (3 пробирки)
Раствор праймеров 0 (GAP)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 1 (MA3)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 2 (MA4)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 3 (MA6)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 4 (MA10)	60 мкл (1 пробирка)

Раствор праймеров 5 (MA12)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 6 (GA)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 7 (NY)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 8 (LA)	60 мкл (1 пробирка)
Раствор праймеров 9 (BA)	60 мкл (1 пробирка)
Вода	1 мл (3 пробирки)
Положительный контрольный образец 1	60 мкл (1 пробирка)
Положительный контрольный образец 2	60 мкл (2 пробирки)

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность анализа:

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками - праймерами, гомологичными определенной конфигурации ДНК-фрагмента клетки. Специфичность обнаружения определенных ДНК-фрагментов 99 %.

Чувствительность анализа:

10^5 копий ДНК-матрицы.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2. Мерами предосторожности является соблюдение требований «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Для проведения исследований необходимо следующее оборудование и материалы, не входящие в комплектацию набора:

-Ламинарный бокс.

-Настольная центрифуга для пробирок на 1,5 мл на 10 - 14 тыс. об/мин.

- Сухой термостат, способный поддерживать температуру в диапазоне от 37°C до 100°C.
- Вортекс для встряхивания пробирок.
- Дозаторы (автоматические лабораторные пипетки) на 20, 200, 1000 мкл.
- Прибор для амплификации ДНК. Рекомендуется использовать PTC-220 DNA Engine Dyad Cyclor BIO-RAD (США).
- Камера для горизонтального электрофореза в агарозном геле длиной не менее 10 см.
- Источник постоянного тока с напряжением не менее 200 В.
- Прибор для фотодокументации гелей.
- УФ-трансиллюминатор (254 или 302 нм).
- Спектрофотометр Nanodrop 8000 (США).
- Весы лабораторные для взвешивания реактивов.
- Ступка лабораторная фарфоровая с пестиком d=75мм или TissueLyser («Qiagen», США) (для биопсийного материала).
- Шприц и игла (0,9 мм) или QIAshredder («Qiagen», США) (для биопсийного и клеточного материала).
- Штативы для пробирок 1,5, 0,5 и 0,2 мл.
- Ножницы прямые.
- Емкость для сброса использованных наконечников.
- Наконечники для лабораторных пипеток разовые с фильтром и без фильтра на 20, 200 и 1000 мкл.
- Пробирки лабораторные на 10 мл, 50 мл, 1,5 мл, 0,5 мл и 0,2 мл.
- Перчатки медицинские одноразовые.
- 14,3 М β-меркаптоэтанол.
- Азот.
- Агароза.
- Бромид этидия.
- Вода для инъекций.

- Набор для выделения РНК «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США) или аналогичный.
- Набор для обратной транскрипции «RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase» («Fermentas», Латвия) или аналогичный.
- Ингибитор рибонуклеаз «RNasin® Ribonuclease Inhibitor» («Promega», США) или аналогичный.
- ДНКаза «RQ1 RNase-Free DNase» («Promega», США) или аналогичная.
- Маркер молекулярного веса «O'GeneRuler 50 bp DNL Ladder» («Fermentas», Латвия) или аналогичный.
- Этанол.
- Раствор трис-боратного буфера пятикратный (TBEx5).

6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используется биопсийный материал пациентов – свежезамороженные фрагменты тканей или фрагменты тканей, стабилизированные в RNA- *later* RNA Stabilization Reagent («Qiagen», США) или аналогичном стабилизационном буфере. Данный набор реагентов может также использоваться для клинических и научных исследований клеточных линий и первичных клеточных культур, полученных из опухолевых тканей пациентов. Хранение полученного материала осуществляется при следующих условиях:

- свежезамороженные образцы - при температуре -70°C;
- стабилизированные образцы – согласно инструкции к стабилизационному буферу.

Срок хранения биопсийного материала – не более 1 года с момента взятия пробы.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Схема проведения исследования дана в Приложении 1.

7.1. Выделение РНК

7.1.1. Процедура выделения РНК из анализируемого материала

Реагенты для выделения РНК не входят в комплектацию данного набора. Рекомендуется использовать набор «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США) или аналогичный. Выделение РНК осуществляется согласно Инструкции по применению соответствующего набора.

7.1.2. Процедура оценки количества выделенной РНК

Для получения достоверных и качественных результатов при амплификации рекомендуется провести предварительную оценку концентрации полученной РНК одним из приведенных методов.

Спектрофотометрический метод:

Оценку концентрации РНК проводят с помощью спектрофотометра Nanodrop («Thermo», США) или аналогичного. 2 – 3 мкл раствора, содержащего выделенную РНК, наносят на рабочую поверхность прибора и запускают программу анализа РНК, входящую в комплект программного обеспечения спектрофотометра. В качестве контроля рекомендуется использовать аналогичный объем буферного раствора из набора для выделения РНК, использованного на последнем этапе выделения для растворения РНК. Максимум поглощения в исследуемых образцах должен наблюдаться при длине волны 260 нм. Пригодными для работы признаются образцы РНК с концентрацией 50 - 1500 нг/мкл. В случае выявления низкой концентрации РНК необходимо повторить процедуру выделения РНК (п.7.1.1.).

Спектрофлуориметрический метод:

Оценку концентрации РНК проводят с помощью спектрофлуориметра и набора реагентов и стандартов для определения концентрации РНК. Рекомендуется использовать набор «Qubit» («Life Technologies», США) в соответствии с инструкцией производителя.

7.1.3. Процедура обработки выделенной РНК ДНКазой

Реагенты для обработки растворов выделенной РНК ДНКазой не входят в комплектацию данного набора. Для проведения данной процедуры рекомендуется использовать ДНКазу из набора «RQ1 RNase-Free DNase»

(«Promega», США) или аналогичную. Обработка ДНКазой осуществляется согласно Инструкции по применению соответствующего набора.

7.2. Реакция обратной транскрипции (ОТ)

7.2.1. Процедура реакции обратной транскрипции (ОТ)

Реагенты для проведения реакции ОТ не входят в комплектацию данного набора. Для проведения данной реакции используются реагент «RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase» («Fermentas», Латвия) или аналогичный. В качестве олигонуклеотидных затравок рекомендуется использовать набор «Random Hexamer Primer» («Fermentas», Латвия), а для ингибирования РНКаз – набор «RNasin® Ribonuclease Inhibitor» («Promega», США) или аналогичный.

Для каждого из исследуемых образцов маркируют по две пробирки вместимостью 0,5 мл каждая: «n-RT+» и «n-RT-», где n – номер анализируемого образца (1, 2, 3 и т.д.). В каждую пробирку добавляют по 0,6 – 1,5 мкг РНК в расчете на каждую пробу и далее следуют указаниям Инструкции к используемому набору. Хранение пробирок с готовой реакционной смесью осуществляется при температуре -70°C в течение 6 месяцев.

7.3. Оценка качества выделенной РНК

Контроль качества выделенной РНК и материала реакции ОТ проводят с использованием праймеров к гену GAPDH (праймеры 0 (GAP)), который экспрессируется во всех клетках человеческого организма. Размер амплифицируемого фрагмента для пары праймеров 0 (GAP) составляет 220 п.н.

7.3.1. Извлечь из холодильника за 20 – 30 мин до приготовления амплификационной смеси раствор праймеров 0 (GAP), положительный контрольный образец 1, ПЦР-растворитель и воду. Содержимое пробирок с реагентами разморозить при комнатной температуре, тщательно встряхнуть и поместить пробирки в ледяную баню, которую разместить рядом с ламинарным боксом.

7.3.2. Извлечь из холодильника готовые пробирки с ПЦР-смесью и промаркировать их в соответствии с количеством анализируемых проб маркировкой «n-0RT+» и «n-0RT-», где n – номер анализируемой пробы (1, 2, 3 и т.д.).

7.3.3. Промаркировать по 1 пробирке с ПЦР-смесью для отрицательного (маркировка «0К-») и положительного (маркировка «0К+») контрольных образцов.

7.3.4. Пробирки с реакционными смесями «п-RT+» и «п-RT-» извлечь из холодильника непосредственно перед добавлением их содержимого в амплификационную смесь. Во все маркированные пробирки добавить реагенты согласно Таблице 2.

Таблица 2

Реагент	Маркировка пробирок			
	«0К+»	«0К-»	«п-0RT+»	«п-0RT-»
ПЦР-растворитель	10 мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл
Вода	7 мкл	8 мкл	7 мкл	7 мкл
Раствор праймеров 0 (GAP)	2 мкл	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Положительный контрольный образец 1	1 мкл	-	-	-
Реакционная смесь «п-0RT+»	-	-	1 мкл	-
Реакционная смесь «п-0RT-»	-	-	-	1 мкл

Примечание:

Общий объем амплификационной смеси должен составлять 20 мкл.

7.3.5. Пробирки с амплификационной смесью поместить в блок амплификатора и провести амплификацию по следующей программе (Таблица 3):

Таблица 3

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94	2 мин	1
94	40 сек	26
55	1 мин	
72	1 мин	
72	2 мин	1

7.3.6. Провести детекцию продуктов амплификации согласно п.7.4.

7.3.7. Регистрацию результатов детекции провести согласно п.8.1. Учет результатов исследования представлен в Таблице 8.

Пример электрофореграммы экспрессии гена GAPDH приведен в Приложении 2.

7.4. Амплификация

7.4.1. Извлечь из холодильника за 20 – 30 мин до приготовления амплификационной смеси растворы праймеров к РТ-антигенам, положительный контрольный образец 2, ПЦР-растворитель и воду, содержимое пробирок с реагентами разморозить при комнатной температуре, тщательно встряхнуть и поместить пробирки в ледяную баню, которую разместить рядом с ламинарным боксом.

7.4.2. Извлечь из холодильника готовые пробирки с ПЦР-смесью и промаркировать их в соответствии с анализируемым антигеном маркировкой «n-mRT+» и «n-mRT-», где m – номер раствора праймеров к анализируемому антигену (1, 2, 3 и т.д.), n – номер анализируемого образца (1, 2, 3 и т.д.).

Пример приведен в Таблице 4.

Таблица 4

Номер раствора праймеров	Маркировка пробирок с ПЦР-смесью					
	Анализируемый образец 1		Анализируемый образец 2		Анализируемый образец n	
	«1-RT+»	«1-RT-»	«2-RT+»	«2-RT-»	«n-RT+»	«n-RT-»
1	«1-1RT+»	«1-1RT-»	«2-1RT+»	«2-1RT-»	«n-1RT+»	«n-1RT-»
2	«1-2RT+»	«1-2RT-»	«2-2RT+»	«2-2RT-»	«n-2RT+»	«n-2RT-»
3	«1-3RT+»	«1-3RT-»	«2-3RT+»	«2-3RT-»	«n-3RT+»	«n-3RT-»
m	«1-mRT+»	«1-mRT-»	«2-mRT+»	«2-mRT-»	«n-mRT+»	«n-mRT-»

7.4.3. Маркировать пробирки для отрицательного (маркировка «mK-») и положительного (маркировка «mK+» и т.д.) контрольных образцов, где m – номер соответствующего раствора праймеров (1, 2, 3 и т.д.)

7.4.4. Пробирки с продуктами реакции ОТ «n-RT+» и «n-RT-» извлечь из холодильника непосредственно перед добавлением их содержимого в амплификационную смесь. Во все маркированные пробирки добавить реагенты согласно Таблице 5.

Таблица 5

Реагент	Маркировка пробирок			
	«mK+»	«mK-»	«n-mRT+»	«n-mRT-»
ПЦР-растворитель	10 мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл
Вода	7 мкл	8 мкл	7 мкл	7 мкл
Раствор праймеров 1 или 2, или 3 и т.д.	2 мкл	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Положительный контрольный образ- ец 2	1 мкл (*)	-	-	-
Реакционная смесь «n-0RT+»	-	-	1 мкл	-
Реакционная смесь «n-0RT-»	-	-	-	1 мкл

Примечание:
 (*) – положительный контрольный образец 2 используют без разведения при проведении 26 циклов амплификации (Таблица 6). При большем количестве циклов необходимо использовать 1 мкл соответствующего разведения положительного контрольного образца 2 для анализируемого антигена (Таблица 7).
 Общий объем амплификационной смеси должен составлять 20 мкл.

7.4.5. Амплификацию проводят по программе согласно Таблице 6:

Таблица 6

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94	2 мин	1
94	40 сек	30-37 (*)
55	1 мин	
72	1 мин	
72	2 мин	1

Примечание:

(*) - Количество циклов амплификации зависит от анализируемого антигена. Рекомендуется использовать следующее количество циклов амплификации и разведений положительного контрольного образца 2, приведенные в Таблице 7:

Таблица 7

Наименование рас- твор праймеров	Рекомендуемое кол-во циклов амплификации	Рекомендуемые разведения поло- жительного контр. образца 2
1 (MA3)	34	1:100
2 (MA4)		
3 (MA6)		
4 (MA10)		
5 (MA12)	37	1:500
6 (GA)	30	1:10
7 (NY)	37	1:500
8 (LA)	30	1:10
9 BA)	34	1:100

7.5. Детекция продуктов амплификации

7.5.1. Приготовление буферного раствора для проведения электрофореза

Буферный раствор TBE $\times$ 5 готовят из сухой смеси производства «Sigma» согласно инструкции. Для проведения электрофореза используют буфер TBE $\times$ 1 (на 4 объема воды добавить 1 объем буферного раствора TBE $\times$ 5).

7.5.2. Приготовление раствора бромида этидия концентрации 10 мг/мл

100 мг бромида этидия поместить в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавить воду для инъекций, тщательно перемешать и довести этой же водой до метки.

7.5.3. Приготовление агарозного геля концентрации 1,5 %

Собрать установку для горизонтального электрофореза и установить гребенку в камеру.

Для проведения электрофореза готовят смесь агарозного геля в концентрации 1,5 %. Для этого в мерный термостойкий стакан вместимостью 250 мл добавить 1,5 г агарозы, 100 мл буфера TBE $\times$ 1 и все тщательно перемешать. Стакан поместить в водяную баню при температуре 90 - 95°C, при постоянном помешивании довести содержимое стакана до полного расплавления и после этого вынуть стакан из водяной бани. Полученный раствор агарозы должен быть прозрачным. Расплавленную агарозу охладить до температуры 60°C, добавить в нее 1,5 мкл раствора бромида этидия концентрации 10 мг/мл и тщательно перемешать содержимое стакана равномерными вращательными движениями. Расплавленную агарозу залить слоем 0,4 – 0,6 см в камеру прибора для горизонтального электрофореза. После застывания агарозы (через 25 - 35 мин) осторожно вынуть гребенку и залить буфер TBE $\times$ 1 в камеру в количестве, обеспечивающем полное погружение геля.

7.5.4. Проведение электрофореза

В лунки агарозного геля внести по 5 мкл образцов в последовательности, соответствующей нумерации проб, а также контрольные образцы и мар-

кер молекулярного веса. Электрофоретическую камеру подключить к источнику питания, установить значение напряжения в 140 В и провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за процессом разделения осуществляют визуально по движению полосы красителя (ксиленцианола), которая должна пройти не менее 3 см.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Гель на подложке аккуратно перенести на стекло УФ-трансиллюминатора с длиной волны 254 нм или 302 нм.

8.2. Полученные результаты документируют фотографированием геля с использованием соответствующих светофильтров.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Учет результатов исследования проводят согласно Таблице 8.

При детекции в образце полос соответствующего размера и соблюдении всех условий, представленных в Таблице 8, полученный результат интерпретируется как положительный и выдается заключение о наличии экспрессии соответствующих раково-тестикулярных антигенов, что может использоваться для дальнейшей дифференциальной диагностики и выбора метода иммунокоррекции.

Пример электрофореграммы экспрессии РТА приведен в Приложении 3.

Таблица 8

Образцы	Результаты амплификации на электрофореграмме	Размер амплифицируемого участка (п.н.)	Название семейства генов
Оценка качества выделенной РНК:			
Положительный контрольный образец 1 (OK+)	Одна полоса	220	GAPDH
Исследуемый образец (RT+)	Одна полоса	220	GAPDH
Отрицательный контрольный образец (OK-)	Отсутствие полос размером 220 п.н.		
Исследуемый образец (RT-)	Отсутствие полос размером 220 п.н.		
Реакция амплификации:			
Положительный контрольный образец 2 (mK+)	Одна полоса	314	MAGE A3 (ген CT1.3)
		284	MAGE A4 (ген CT1.4)
		297	MAGE A6 (ген CT1.6)
		310	MAGE A10 (ген CT1.10)
		289	MAGE A12 (ген CT1.12)
		258 ¹⁾	GAGE1 (гены CT4.2 – CT4.8)
		233	NY-ESO-1 (ген CT6.1)
		233 ²⁾	LAGE-1a (ген CT6.2a)
		186 ³⁾	BAGE (гены CT2.2, CT2.3)
Отрицательный контрольный образец (mK-)	Отсутствие полос соответствующих размеров (см. выше)		
Исследуемый образец (n-mRT-)	Отсутствие полос соответствующих размеров (см. выше)		
Примечание:			
1) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 6 (GA)может детектироваться фрагмент ДНК, имеющий размер 401 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственного гена GAGE1(CT4.1).			
2) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 8 (LA)может детектироваться фрагмент ДНК, имеющий размер 462 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственного гена LAGE1b(CT6.2b).			
3) – на электрофореграмме исследуемого образца (n-mRT+)с праймерами 9 (BA)могут детектироваться фрагменты ДНК, имеющие размер 256 и 328 п.н., что свидетельствует об экспрессии близкородственных генов BAGE5(CT2.5) и BAGE1(CT2.1).			
Сигнал должен регистрироваться в виде хорошо различимой полосы соответствующего данным праймерам размера. Если возникли сложности с регистрацией сигнала, необходимо следовать процедурам, описанным в Приложении 4.			

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре:

4°C - 2°C – ПЦР-смесь и ПЦР-растворитель;

$(-20^{\circ}\text{C}) - (-18^{\circ}\text{C})$ - вода, контрольные образцы ДНК и растворы праймеров.

Срок годности набора – 1 год.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По всем вопросам, касающимся применения и качества данного набора, обращаться по адресу: Учреждение Российской академии наук

Институт биологии гена РАН

119334, Москва, ул.Вавилова, 34/5

Тел./ф.: 4991354105, 4991359970

Заведующий лабораторией генной терапии

C. Rafines

С.С.Ларин

«СОГЛАСОВАНО»

**Главный врач РОНЦ
им. Н.Н.Блохина РАМН,
профессор, д.м.н.**

Grech

Сельчук В.Ю.

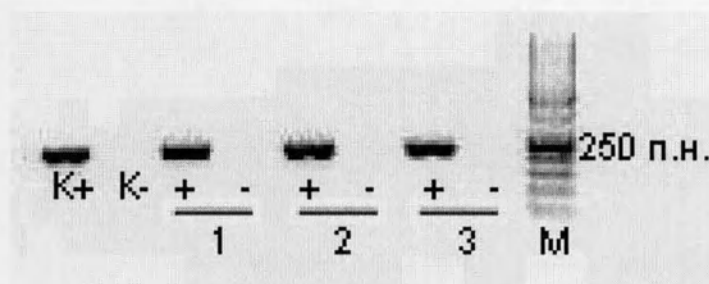
«02» сентября 2010 г.



СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ



ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА GAPDH



«K+» – положительный контрольный образец 1,

«K-» – отрицательный контрольный образец,

«1» – биопсийный материал слизистой ротовой полости здорового донора,

«2» – биопсийный материал рака молочной железы человека,

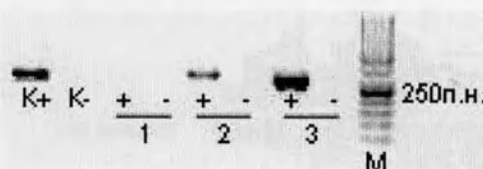
«3» – клеточная линия меланомы человека,

Полосы: «+» – «RT+»,

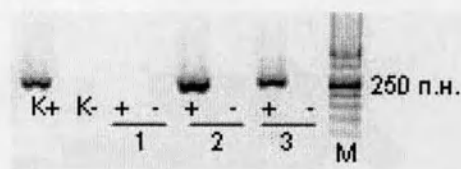
«-» – «RT-»,

M – маркер молекулярного веса ДНК «O'Gene Ruler 50bp DNA Ladder».

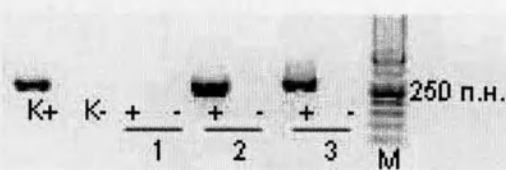
ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА ЭКСПРЕССИИ РАКОВО- ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ



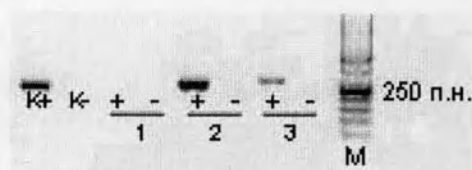
Праймер 1 (МА3)



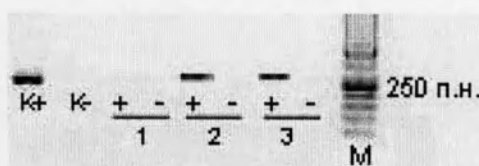
Праймер 2 (МА4)



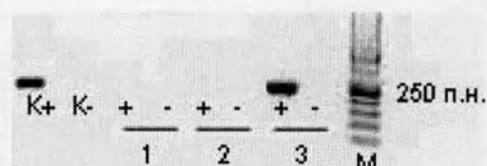
Праймер 3 (МА6)



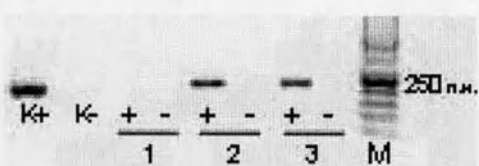
Праймер 4 (МА10)



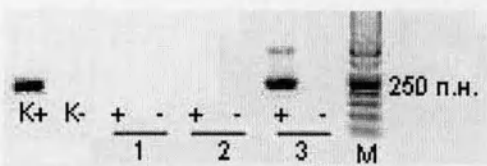
Праймер 5 (МА12)



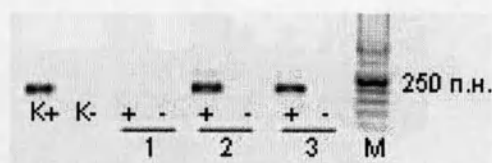
Праймер 6 (GA)



Праймер 7 (NY)



Праймер 8 (LA)



Праймер 9 (BA)

«K+» – положительный контрольный образец 2,

«K-» – отрицательный контрольный образец,

«1» – биопсийный материал слизистой ротовой полости здорового донора,

«2» – биопсийный материал рака молочной железы человека,

«3» – клеточная линия меланомы человека,

Полосы: «+» – «RT+»,

«-» – «RT-»,

M – маркер молекулярного веса ДНК «O'Gene Ruler 50bp DNA Ladder».

ВАРИАНТЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
Продукт ПЦР не регистрируется в виде хорошо различимого сигнала – полосы. 	Отсутствие какого-либо компонента реакции или его порча в процессе хранения.	1. Проверить правильность приготовления растворов и реакционных смесей. 2. Проверить работу реагентов в контрольной ПЦР с использованием контрольных образцов. 3. Проверить условия хранения реагентов набора.
	Недостаточное число циклов ПЦР.	1. Увеличить число циклов ПЦР, добавляя по 4 цикла каждый раз.
	Слишком низкая или высокая концентрация РНК-матрицы.	1. Сделать серию последовательных разведений матрицы.
	Плохое качество РНК	1. Проверить качество анализируемого материала. 2. Повторить процедуру выделения РНК.
Продукт ПЦР выглядит как много полос или шумер при анализе на агарозном геле. 	Избыточное количество циклов ПЦР.	1. Повторить реакцию, контролируя появление ПЦР-продукта при меньшем числе циклов.
	Контаминация посторонней ДНК.	1. Контролировать уровень контаминации компонентов ПЦР, приборов и помещения с помощью негативного контроля. При обнаружении контаминации провести процедуру деонтаминации согласно требованиям нормативных документов.
	Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы.	1. Сделать серию последовательных разведений матрицы.
Появление сигнала в пробах «RT-».	Контаминация исследуемых образцов остаточной геномной ДНК.	1. Повторить процедуру обработки выделенной РНК ДНКазой (п.7.1.3.).
	Контаминация реактивов, оборудования и помещения продуктами ПЦР.	1. Провести процедуру деонтаминации.

Протестиро-
вано и
протестиро-
вано

