

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *bcr-abl* (вариант *M-bcr*) и мРНК гена *abl* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

«АмплиСенс[®] Лейкоз Квант *M-bcr-FRT*»

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ	3
ЭТАП 1. Выделение РНК из КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	4
ЭТАП 2. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР ...	5

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! При проведении анализа рекомендуем принимать во внимания дополнения и уточнения, приведенные ниже.

Клетки пунктата костного мозга.

В случае проведения исследования в количественном формате 200 мкл пунктата костного мозга немедленно после забора помещают в 800 мкл раствора D из прилагающегося комплекта реагентов «РИБО-золь-D» и перемешивают. Пробирки центрифугируют 5 мин при 5 тыс. об/мин и, в случае наличия осадка, супернатант переносят в новую пробирку (далее работают с супернатантом). Разделить полученный лизат на 2 равные части, для этого отобрать по 400 мкл лизата в чистые пробирки на 1,5 мл.

В случае проведения исследования в качественном формате 100 мкл пунктата костного мозга немедленно после забора помещают в 400 мкл раствора D из прилагающегося комплекта реагентов «РИБО-золь-D» и перемешивают. Пробирки центрифугируют 5 мин при 5 тыс. об/мин и, в случае наличия осадка, супернатант переносят в новую пробирку (далее работают с супернатантом).

Лизированный образец допускается хранить до дальнейшей обработки при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С до 1 месяца и температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

ЭТАП 1. Выделение РНК из КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.

ВНИМАНИЕ! При проведении анализа рекомендуем принимать во внимания дополнения и уточнения, приведенные ниже.

Уточнения к пункту 1. Лизис.

Вариант 1. Кровь с ЭДТА.

а) Обработка крови реагентом «Гемолитик»:

При невозможности отобрать лейкоцитарное кольцо провести этап отмывки клеток белой крови при помощи реагента «Гемолитик». Для этого в случае проведения исследования в количественном формате в отдельную пробирку объемом 10 мл для каждого образца внести **7,0 мл гемолитика** и добавить **2,5 мл цельной крови**. В случае проведения исследования в качественном формате в отдельную пробирку объемом 10 мл для каждого образца внести **3,5 мл гемолитика** и добавить **1,25 мл цельной крови**. Полученный раствор перемешать на вортексе и центрифугировать 5 мин при 3 тыс. об/мин. Супернатант отобрать, не задевая осадка.

Добавить в каждую пробирку с осадком клеток **400 мкл раствора D** в случае проведения исследования в качественном формате или **800 мкл раствора D** в случае проведения исследования в количественном формате. Лизированный таким образом образец может храниться при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С в течение 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения исследования в количественном формате разделить полученный лизат на 2 равные части: для этого отобрать по 400 мкл лизата в чистые пробирки на 1,5 мл.

б) Обработка клеток крови «лейкоцитарного кольца» (без использования «Гемолитика»):

В случае проведения исследования в качественном формате отобрать необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл, внести в них по **400 мкл раствора D** и 100 мкл отобранных белых клеток крови (не позднее чем через 48 часов после забора крови при условии хранения цельной крови при температуре от 2 до 6 °С), перемешать.

В случае проведения исследования в количественном формате отобрать необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл, внести в них по **800 мкл раствора D** и около **200 мкл** отобранных белых клеток крови (не позднее чем через 48 часов после забора крови при условии хранения цельной крови при температуре от 2 до 6 °С), перемешать.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения исследования в количественном формате разделить полученный лизат на 2 равные части: для этого отобрать по 400 мкл лизата в чистые пробирки на 1,5 мл.

Лизированный таким образом образец может храниться при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С в течение 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

Вариант 2. Кровь с РНК-стабилизатором.

В случае проведения исследования в количественном формате обработку начать с разделения образца на 2 равные части. Для этого в 2 отдельные пробирки на 5 мл отобрать по 4,5 мл образца.

В случае проведения исследования в качественном формате в отдельную пробирку на 5 мл отобрать по 4,5 мл образца.

Произвести центрифугирование 10 мин при 3500-5000g. Отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадка. Добавить к осадку 4 мл воды mQ, перемешивать на вортексе до растворения осадка. Допустимо наличие небольших количеств нерастворившегося дебриса. Центрифугировать 10 мин при 3500-5000g. Отобрать надосадочную жидкость полностью.

Добавить в каждую пробирку с осадком **400 мкл раствора D**.

Лизированный таким образом образец может храниться при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С в течение 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

ЭТАП 2. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР

ВНИМАНИЕ! При проведении анализа рекомендуем принимать во внимания дополнения и уточнения, приведенные ниже.

Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

При постановке ПЦР в количественном формате со смесью для выявления N-Abl рекомендуем поставить 5 контрольных образцов - ДНК-калибраторов. Для приготовления реакционной смеси используйте формулу:

(N+7) * 7,0 мкл ПЦР-смеси-1-FRT N-abl

(N+7) * 7,5 мкл ПЦР-буфера-FRT

(N+7) * 0,5 мкл полимеразы (TaqF),

где 7 = 5 ДНК-стандартов + 1 отрицательный контроль + 1 запас.

При планировании постановки ПЦР для исследования в количественном формате необходимо использовать следующие расчеты:

Одна панель:

18 реакций на ПЦР-смеси-1 bcr-abl

18 реакций на ПЦР-смеси-1 N-abl

12 экстрагированных образцов и 1 ПЦР К- в обе смеси, 5 ДНК-калибраторов в одном повторе каждый.

Две панели:

36 реакций на ПЦР-смеси-1 bcr-abl

36 реакций на ПЦР-смеси-1 N-abl

24 экстрагированных образца и 2 ПЦР К- в обе смеси, 5 ДНК-калибраторов в двух повторах каждый.

Проведение амплификации (ПЦР)

При программировании прибора «ABIPrism» 7х00 задается референсный краситель ROX.