

## **РУКОВОДСТВО**

### **ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

**ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ХРОМОСОМНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ  
ПРИ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ЛЕЙКОЗАХ МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ  
НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПАХ «ЛК-БИОЧИП»\***



*\* Руководство составлено на основе «Инструкции по применению набора реагентов для выявления и идентификации хромосомных транслокаций при острых и хронических лейкозах методом гибридизации с флуоресцентным изображением на биологическом микрочипе (ЛК-БИОЧИП®)», утвержденной Федеральной Службой надзора в сфере здравоохранения и социального развития и рекомендованной Комиссией по наборам реагентов для иммуноферментного (неинфекционные), радиоиммунологического и других видов иммунохимического анализа. Регистрационное удостоверение: № ФС 01262006/4756-06 от 28 декабря 2006 г.*

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

- 1.1. Набор реагентов «ЛК-Биочип» предназначен для выявления и идентификации основных хромосомных транслокаций при острых и хронических лейкозах в образцах костного мозга или периферической крови человека методом мультиплексной полимеразной цепной реакции - обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе.
- 1.2. При постановке диагноза и лечении лейкозов большое значение имеют не только клинические данные, но и результаты молекулярно-генетического анализа. В настоящее время известно более 50 различных транслокаций, характерных для определенных типов лейкозов. Многие из этих транслокаций приводят к аномальной экспрессии соответствующих белков, в том числе транскрипционных факторов. При этом, помимо гиперэкспрессии белка, может наблюдаться экспрессия химерного белка, обладающего онкогенным потенциалом. В этом случае, удобным объектом для молекулярно-биологических скрининговых исследований является химерная ДНК или РНК. С помощью ОТ-ПЦР химерные молекулы РНК могут быть обнаружены в опухолевых клетках даже после окончания лечения, при минимальной остаточной болезни.  
Набор реагентов «ЛК-Биочип» предназначен для выявления и идентификации 13 основных хромосомных транслокаций при острых и хронических лейкозах.
- 1.3. Набор рассчитан на проведение 22 анализов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы (их количество зависит от количества одновременно исследуемых образцов).

## 2. СТАДИИ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

- 2.1. Обратная транскрипция и первая стадия ПЦР с использованием высокоспецифичных праймеров применяются для получения высокоспецифичных копий фрагментов кДНК в случае присутствия хромосомных транслокаций в исследуемом образце (костный мозг, кровь).
- 2.2. Вторая стадия ПЦР с использованием флуоресцентно-меченного дУТР применяется для дальнейшего увеличения копий фрагментов кДНК и получения ПЦР-продукта, содержащего флуоресцентную метку – для последующей визуализации результатов гибридизации на биологическом микрочипе.
- 2.3. Биологический микрочип представляет собой подложку (предметное стекло/полимерный материал) с иммобилизованными зондами, специфичными к основным типам транслокаций. Транслокация определяется при возбуждении флуоресценции меченого ПЦР-продукта, связавшегося с зондами, иммобилизованными на биологическом чипе. Интерпретация результатов осуществляется программно (полуавтоматически) в зависимости от того, с какими из иммобилизованных зондов прошла реакция гибридизации.

## 3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

**Комплект № 1** для постановки обратной транскрипции с использованием тотальной РНК, выделенной из клинического материала и проведения ПЦР, включающий:

- «**MMLV**» (обратная транскриптаза, 200 Ед/мкл) - 1 пробирка (0,022 мл);
- «**дНТФ-1**» (водный раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов) -1 пробирка (0,09 мл);
- «**RNAsin**»(ингибитор РНКазы, 40 Ед/мкл;) -1 пробирка (0,01 мл);
- «**Деп-В**» (вода, обработанная диэтилпирокарбонатом) -1 пробирка (0,11 мл);
- «**ПЦР-буф**» (10-кратный буфер для ПЦР) -1 пробирка (0,6 мл);
- «**ОТ-буф**» (10-кратный буфер для обратной транскрипции) -1 пробирка (0,06 мл);
- «**MgCl<sub>2</sub>**» (25 мМ магния хлорид) -1 пробирка (0,5 мл);
- «**дНТФ-2**» (раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов, содержащий дУТР-Су5)-1 пробирка (0,060 мл);
- «**ПР-ОТ**» (лиофилизированная смесь праймеров для обратной транскрипции)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**ПР-1.1**» (лиофилизированная смесь праймеров для проведения первой стадии ПЦР)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**ПР-1.2**» (лиофилизированная смесь праймеров для проведения первой стадии ПЦР)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**ПР-1.3**» (лиофилизированная смесь праймеров для проведения первой стадии ПЦР)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**ПР-1.4**» (лиофилизированная смесь праймеров для проведения первой стадии ПЦР)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**ПР-2.1**» (лиофилизированная смесь праймеров для проведения второй стадии ПЦР)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**ПР-2.2**» (лиофилизированная смесь праймеров для проведения второй стадии ПЦР)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**ПР-2.3**» (лиофилизированная смесь праймеров для проведения второй стадии ПЦР)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**ПР-2.4**» (лиофилизированная смесь праймеров для проведения второй стадии ПЦР)
  - -1 пробирка (0,05 г);
- «**Тaq**» (Тaq-полимераза, 5 Ед/мкл) -1 пробирка (0,12 мл);
- «**В**» (вода стерильная) - 1 пробирки (4,2 мл);

***В набор входят два внутренних контроля:***

- «**К+**» (положительный контрольный образец кДНК, несущий транслокацию) -1 пробирка (0,005 мл);
- «**К-**» (отрицательный контроль образец кДНК, не несет транслокаций) -1 пробирка (0,005 мл);

**Комплект № 2** для проведения гибридизации на микрочипе, включающий:

- «**ГБ** » (2 кратный буфер для гибридизации) -1 пробирка (0,5 мл);
- «**ПБ** » (20 кратный буфер для отмывки) -1 флакон (20 мл);

**Комплект № 3**, включающий **биологические микрочипы**, каждый из которых рассчитан на проведение одного исследования хромосомных транслокаций– 22 штуки.

#### **4. ТРЕБОВАНИЯ К ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ.**

4.1. Специфичность. Набор специфично выявляет хромосомные транслокации

при острых и хронических лейкозах в исследуемом образце (костного мозга или крови).

- 4.2. Чувствительность. Набор способен выявлять 1000 опухолевых клеток в 1 мл костного мозга /крови ( не менее 1 опухолевой клетки среди 1000 нормальных клеток).

## **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

- 5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.
- 5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях нетоксичны.
- 5.3. При работе с набором необходимо соблюдать требования "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.; «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности» Методические указания МУ 1.3.1794-03 МЗ РФ, 2003 г.
- 5.4. ПЦР-лаборатория должна включать следующий минимальный набор рабочих зон: приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала, выделения НК, приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР, и зону детекции продуктов амплификации методом электрофореза или гибридизации.
- 5.5. Все работы должны выполняться только с использованием одноразовых автоклавированных/стерильных наконечников с фильтром для полуавтоматических пипеток.
- 5.6. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
- 5.7. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.
- 5.8. Строго соблюдают условия хранения всех реагентов и образцов ДНК согласно инструкции к набору реагентов. Образцы РНК хранят отдельно от реагентов при температуре минус  $-20^{\circ}$ - $70^{\circ}$  С. Не допускается использование реагентов с истекшим сроком годности или хранившихся в условиях, не соответствующих требованиям, изложенным в инструкциях.
- 5.9. Сотрудники каждой рабочей зоны должны быть обеспечены спецодеждой: медицинским халатом, шапочкой, перчатками и сменной обувью. При работе в помещении детекции продуктов амплификации следует надевать бахилы. Перемещение одежды из зоны в зону категорически не допускается. Рекомендуется использование одноразовой одежды. Обработку рабочей одежды из зоны детекции продуктов амплификации проводят отдельно от одежды из других зон.
- 5.10. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 5.11. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

## **6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ**

## ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Микроцентрифуга до 14 000 г для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2,0 мл;
- Встряхиватель вихревой для микропробирок (вортекс);
- Отдельные наборы пипеток полуавтоматических одноканальных со сменными наконечниками, позволяющие забирать объемы жидкости 2, 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл;
- Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками объемом 1,5-2,0 мл;
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10, 100, 200 и до 1 000 мкл;
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без фильтра до 10, 100, 200 и до 1 000 мкл;
- Штативы для микропробирок объемом 1,5-2,0 мл и 0,2 (0,6) мл;
- Холодильник с 2 камерами, поддерживающий температуру +2+8°C и - 20 °C;
- ДНК-амплификатор автоматический;
- Твердотельные термостаты для микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,5 и 1,5-2,0 мл, поддерживающий температуру от +18°C +95 °C;
- Перчатки одноразовые без талька;
- Настольный бокс с бактерицидной лампой или ламинарный шкаф;
- Емкости для сброса отработанных расходных материалов;
- Термостат суховоздушный закрытый, поддерживающий температуру +37 °C;
- Вода дистиллированная;
- Комплекс аппаратно-программный «УАПК»;
- Компьютер (для анализа результатов гибридизации);

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

7.1. Приготовление растворов праймеров для проведения обратной транскрипции и ПЦР.

Содержимое пробирок «ПР-1.1», «ПР-1.2», «ПР-1.3», «ПР-1.4», «ПР-2.1», «ПР-2.2», «ПР-2.3», «ПР-2.4», следует предварительно растворить в 22 мкл стерильной воды («В») каждый, содержимое пробирки «ПР-ОТ» растворить в 44 мкл стерильной воды («В»). Тщательно перемешать до полного растворения, центрифугировать при комнатной температуре ( $t = 18-25^{\circ}\text{C}$ ) 10с 1000g. Готовые растворы хранят в холодильнике при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  -  $-24^{\circ}\text{C}$  в течение 6 месяцев.

7.2. Приготовление промывочного раствора для отмывки микрочипа после гибридизации. 2,5 мл раствора ПБ добавить к 47,5 мл дистиллированной воды, перемешать. Полученной смеси достаточно для обработки 6 микрочипов. Готовый раствор хранят при комнатной температуре  $18^{\circ}\text{C}$  -  $25^{\circ}\text{C}$  в течение 1 недели.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

*Выделение РНК рекомендовано проводить с помощью набора*

**реагентов Qiagen RNeasy Mini Kit (США) или по общепринятой методике экстракции кислым фенолом.**

**8.1. Постановка обратной транскрипции с использованием тотальной РНК, выделенной из клинического материала (комплект № 1).**

8.1.1. Разморозить РНК при +4С. Приготовить пробирку (емкостью 1.5 мл, сертифицированную на отсутствие нуклеазной активности) по одной на каждый образец РНК.

8.1.2. Внести в пробирку 2 мкл раствора «ПР-ОТ» и добавить 13 мкл исследуемой РНК. Полученную смесь инкубировать 3 мин при температуре 70<sup>0</sup>С, затем перенести в лед на 1 мин.

8.1.3. Во время инкубации (на этапе 8.1.2.) приготовить смесь (из расчета 1 пробирка для анализа одного пациента, умноженную на количество пациентов - N). Для этого в пробирку емкостью 1.5 мл, сертифицированную на отсутствие нуклеазной активности, внести:

Деп-В	4,9 x (N) мкл,
ОТ-буф	2,5 x (N) мкл
дНТФ-1	1,2 x (N) мкл,
RNAsin	0.4 x (N) мкл,
Общий объем	9 x (N) мкл

8.1.4. Полученную смесь встряхнуть, центрифугировать при комнатной температуре (t =18-25<sup>0</sup>С) 10с 1000g и внести 9 мкл в пробирку с РНК по завершении этапа 8.1.2, встряхнуть, центрифугировать 10с 1000g, инкубировать при температуре 42<sup>0</sup>С 5 минут.

8.1.5. Добавить 1 мкл MMLV в каждую пробирку и продолжить инкубацию при температуре 42<sup>0</sup>С в течение 1.5 часа. По завершении обратной транскрипции инкубировать 10 минут при температуре 70<sup>0</sup>С. Полученную кДНК хранить при температуре –20<sup>0</sup>С.

**8.2. Приготовление смеси для постановки I этапа ПЦР (комплект № 1).**

8.2.1. Приготовить по 4 пробирки (емкостью 0,2 мл) на каждого пациента для проведения амплификации, промаркировать и расположить их соответствующим образом в штативе.

8.2.2. Внести в каждую пробирку по 1 мкл раствора «ПР-1.1», «ПР-1.2», «ПР-1.3», «ПР-1.4» соответственно. Приготовить смесь (из расчета на 4 пробирки, необходимых для анализа одного пациента и умножить на количество пациентов - N). Для этого в пробирку емкостью 1.5 мл, сертифицированную на отсутствие нуклеазной активности, внести:

Вода стерильная (В)	70 x (N) мкл,
ПЦР-буф	10 x (N) мкл,
MgCl <sub>2</sub>	8 x (N) мкл,
дНТФ-1	2 x (N) мкл,
Taq	2 x (N) мкл,
Общий объем	92 x (N) мкл

8.2.3. Полученную смесь встряхнуть, центрифугировать при комнатной температуре (t =18-25<sup>0</sup>С) 10с 1000g и внести по 23 мкл в пробирки с праймерами. Добавить по 1 мкл кДНК после стадии 8.1.5, после чего все пробирки встряхнуть, и центрифугировать 10с 1000g.

8.2.4. Перенести пробирки в ДНК амплификатор и провести амплификацию по следующей программе:

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
---------------	-----------------	-----------------	-------------------

1	+94 (начальная денатурация ДНК)	3 мин	1
3	+94 (денатурация ДНК)	30 сек	25
	+60 (отжиг праймеров)	30 сек	
	+72 (удлинение фрагментов)	30 сек	
4	+72 (завершающая элонгация)	2 мин	1

### 8.3. Приготовление смеси для постановки II этапа ПЦР (комплект № 1).

8.3.1. Приготовить пробирки (емкостью 0,2 мл) для проведения амплификации, промаркировать и расположить их соответствующим образом в штативе.

8.3.2. Внести в каждую пробирку по 1 мкл раствора «ПР-2.1», «ПР-2.2», «ПР-2.3» и «ПР-2.4» соответственно. Приготовить смесь (из расчета на 4 пробирки, необходимые для анализа одного пациента и умножить на количество пациентов - N). Для этого в пробирку емкостью 1.5 мл, сертифицированную на отсутствие нуклеазной активности, внести:

Вода стерильная (В)	71.4	х (N)	мкл,
ПЦР-буф	10	х (N)	мкл,
MgCl <sub>2</sub>	8	х (N)	мкл,
дНТФ-2	2.6	х (N)	мкл,
Taq	2	х (N)	мкл,
Общий объем	94	х (N)	мкл

8.3.3. Полученную смесь встряхнуть, центрифугировать при комнатной температуре (t = 18-25<sup>0</sup>С) 10с 1000g и внести по 23.5 мкл в пробирки с праймерами. Добавить 0,5 мкл ПЦР продукта I этапа ПЦР после стадии 8.2.4 из пробирок 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, в пробирки 2.1, 2.2, 2.3, и 2.4 соответственно, после чего все пробирки встряхнуть, и центрифугировать 10с 1000g.

8.3.4. Перенести пробирки в ДНК амплификатор и провести амплификацию по ПЦР программе, использовавшейся для ПЦР I раунда.

### 8.4. Проведение гибридизации (комплект №3).

8.4.1. Приготовить пробирки (объемом 1,5-2,0 мл) для проведения гибридизации (из расчета 1 пробирка на образец), пронумеровать и расположить их соответствующим образом в штативе.

8.4.2. Продукты амплификации по 8 мкл из пробирок 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 после стадии 8.3.4 для 1 пациента смешивают в одной пробирке с 12 мкл раствора «ГБ». Полученные смеси встряхнуть центрифугировать при комнатной температуре (t= 18-25<sup>0</sup>С) в течение 10 с при 1000 g.

8.4.3. Готовую гибридизационную смесь денатурируют при температуре +95<sup>0</sup>С в течение 5 мин, охлаждают во льду 2 мин, далее наносят в полном объеме (35 мкл) на микрочип внутрь гибридизационной камеры через отверстия в крышке, после чего плотно закрывают крышку.

8.4.4. Гибридизацию проводят в закрытом суховоздушном термостате (в темноте)

при 37<sup>0</sup>С в течение 14-18 часов.

- 8.4.5. По окончании гибридизации камеру удалить, повернув ее против часовой стрелки. Микрочип промыть в растворе промывочного буфера (*см. подготовку реагентов-пункт 7.2.*) при комнатной температуре в течение 15 минут и ополоснуть дистиллированной водой для предотвращения образования солевых разводов.
- 8.4.6. Высушить микрочип на воздухе до полного исчезновения капель на поверхности подложки 10 -30 минут (возможно, использование сжатого воздуха или азота).

## **8.5. Учет результатов гибридизации.**

- 8.5.1. Результаты гибридизации регистрируют с помощью комплекса программно-аппаратного для анализа изображений биологических микрочипов «УАПК». Инсталляция и эксплуатация комплекса осуществляется в соответствии с Инструкцией по пользованию комплексом «УАПК».
- 8.5.2. Произвести запуск программы «Imageware», которая поставляется вместе с комплексом. При запуске на экране компьютера появиться схема микрочипа с указанием отдельных ячеек и обозначением находящихся в них зондов. Названия зондов соответствуют детектируемым транслокациям (Рис. 1).
- 8.5.3. Биологический микрочип после проведения гибридизации, удаления гибридизационной камеры, ополаскивания и высушивания поместить в держатель «УАПК» так, чтобы активная область, содержащая ячейки геля, оказалась сверху и была ориентированной под оптическую ось прибора.
- 8.5.4. Нажать курсором мыши на закладку «Снимок» и далее на пиктограмму с надписью «Пуск» в верхней части экрана. При этом происходит освещение ячеек микрочипа светом возбуждающих лазеров, автоматический захват изображения и вывод результатов. Программа автоматически выдает результат.
- а) В случае обнаружения определенных хромосомных транслокаций, программа должна выдать сообщение « обнаружен химерный ген..., место слияния...».
  - б) В случае отсутствия хромосомных транслокаций, но положительном прохождении ПЦР и гибридизации, программа должна выдать сообщение «Искомые аберрации не выявлены. ABL-положительный».
  - в) В случае обнаружения более чем одной хромосомной транслокации или неспецифическом прохождении ПЦР (контаминации, ложноположительный результат) программа выдает результат о неспецифическом взаимодействии ПЦР-продукта. Требуется повторное проведение анализа, включая К- (негативный контроль).
  - г) При неудовлетворительном прохождении ПЦР, программа выдает сообщение «Прохождение ПЦР неудовлетворительное. Повторить анализ». В этом случае рекомендуется повторить анализ, включая К+ (положительный контроль).
  - д) Если результаты автоматического определения были неудовлетворительны («Превышено допустимое значение сигнала ячеек...») следует выставить выдержку вручную, таким образом, чтобы интенсивность, высвечиваемая в левом нижнем окошке при наведении курсора мыши на наиболее яркие точки были в пределах 30-50 тысяч единиц.
- 8.5.5. Оператор может визуально проконтролировать флуоресцентное



изображение на биологическом микрочипе. Для этого после завершения процедуры автоматической интерпретации результатов следует переключиться на закладку «Снимок» в правой части экрана и визуально проконтролировать автоматическое наложение сетки на изображения ячеек микрочипа (Рис. 3). В случае некорректного наложения сетки следует навести правой кнопкой мыши на левый нижний угол по оси Y на правой нижний угол по оси X. При этом сетка должна полностью наложиться на изображение микрочипа. После этого следует переключиться на закладку «Отчет» и снова проверить выдаваемые программой результаты (Рис. 4).



Рис. 1. Диалоговое окно режима 'Шаблон'.

(8;21) место слияния	(8;21) место слияния	ABL контрольн ый	0	0	ABL контрольн ый	(9;22) p210 разрыв b3a2	(9;22) p210 разрыв b3a2
(8;21) общий олиг	(8;21) общий олиг	Inv16 место слияния j3	Inv16 место слияния j3	(1;19) место слияния	(1;19) место слияния	(9;22) p210 разрыв b2a2	(9;22) p210 разрыв b2a2
(15;17) bcr3	(15;17) bcr3	Inv16 место слияния j2	Inv16 место слияния j2	(1;19) общий олиг	(1;19) общий олиг	(9;22) p190 разрыв e1a2	(9;22) p190 разрыв e1a2
(15;17) bcr1	(15;17) bcr1	Inv16 место слияния j1	Inv16 место слияния j1	(12;21) место слияния j2	(12;21) место слияния j2	(9;22) общий олиг	(9;22) общий олиг
(15;17) общий олиг	(15;17) общий олиг	Inv16 общий олиг	Inv16 общий олиг	(12;21) место слияния j1	(12;21) место слияния j1	(10;11) 3 место	(10;11) 3 место
(6;11)	(6;11)	(11;19) ENL	(11;19) ENL	(12;21) общий олиг	(12;21) общий олиг	(10;11) 2 место	(10;11) 2 место
(4;11) Exon 5	(4;11) Exon 5	(11;19) ELL 2 место	(11;19) ELL 2 место	(9;11) 2 место	(9;11) 2 место	(10;11) 2 место	(10;11) 2 место
(4;11) Exon 4	(4;11) Exon 4	(11;19) ELL 1 место	(11;19) ELL 1 место	(9;11) 1 место	(9;11) 1 место	(10;11) 1 место	(10;11) 1 место
MLL общий exon 8	MLL общий exon 8	MLL общий exon 9	MLL общий exon 9	MLL общий exon 10	MLL общий exon 10	MLL общий exon 11	MLL общий exon 11
Cy5							Cy5

Рис.2. Схема чипа «ЛК-Биочип»

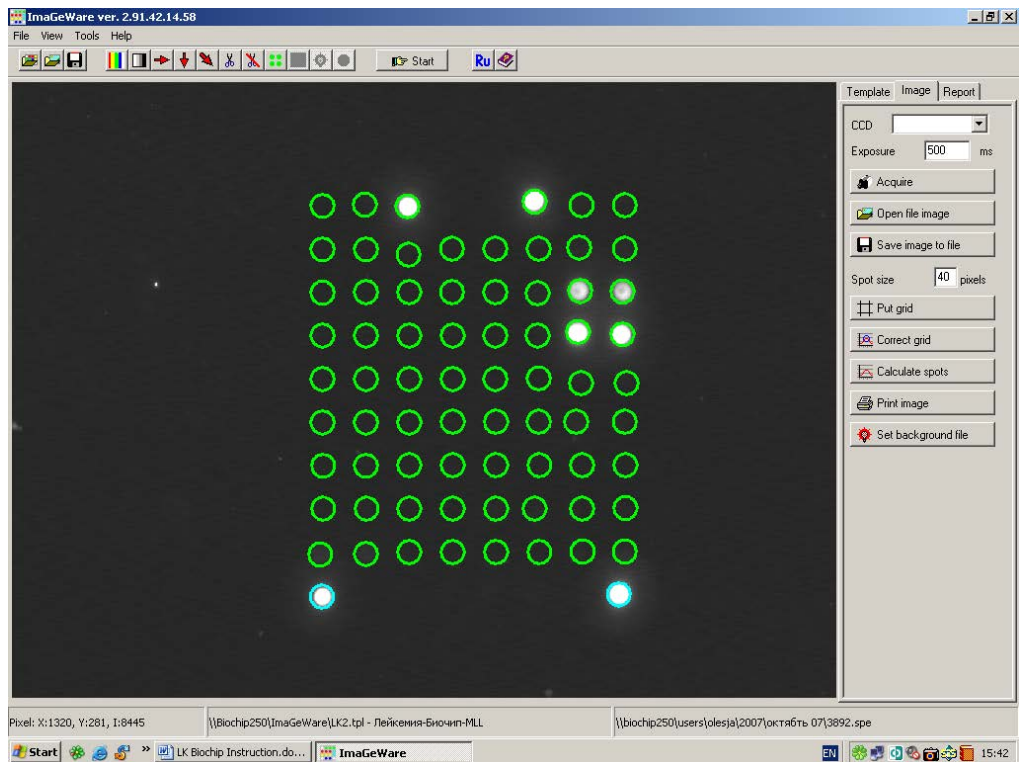


Рис. 3. Диалоговое окно режима 'Снимок'.

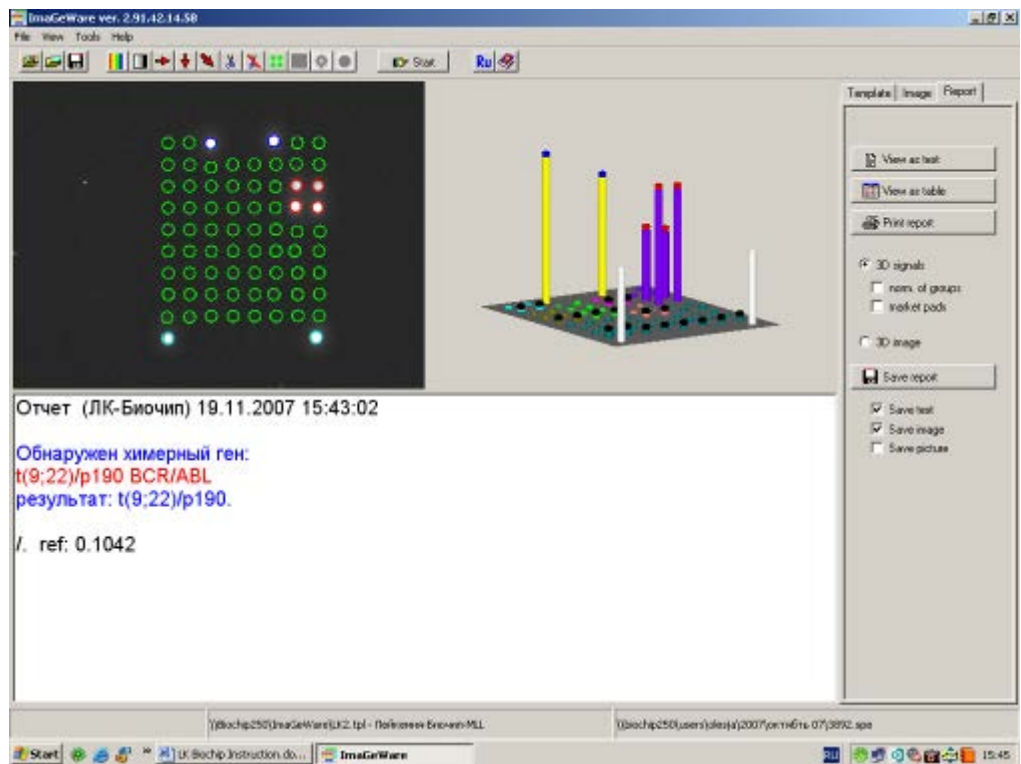
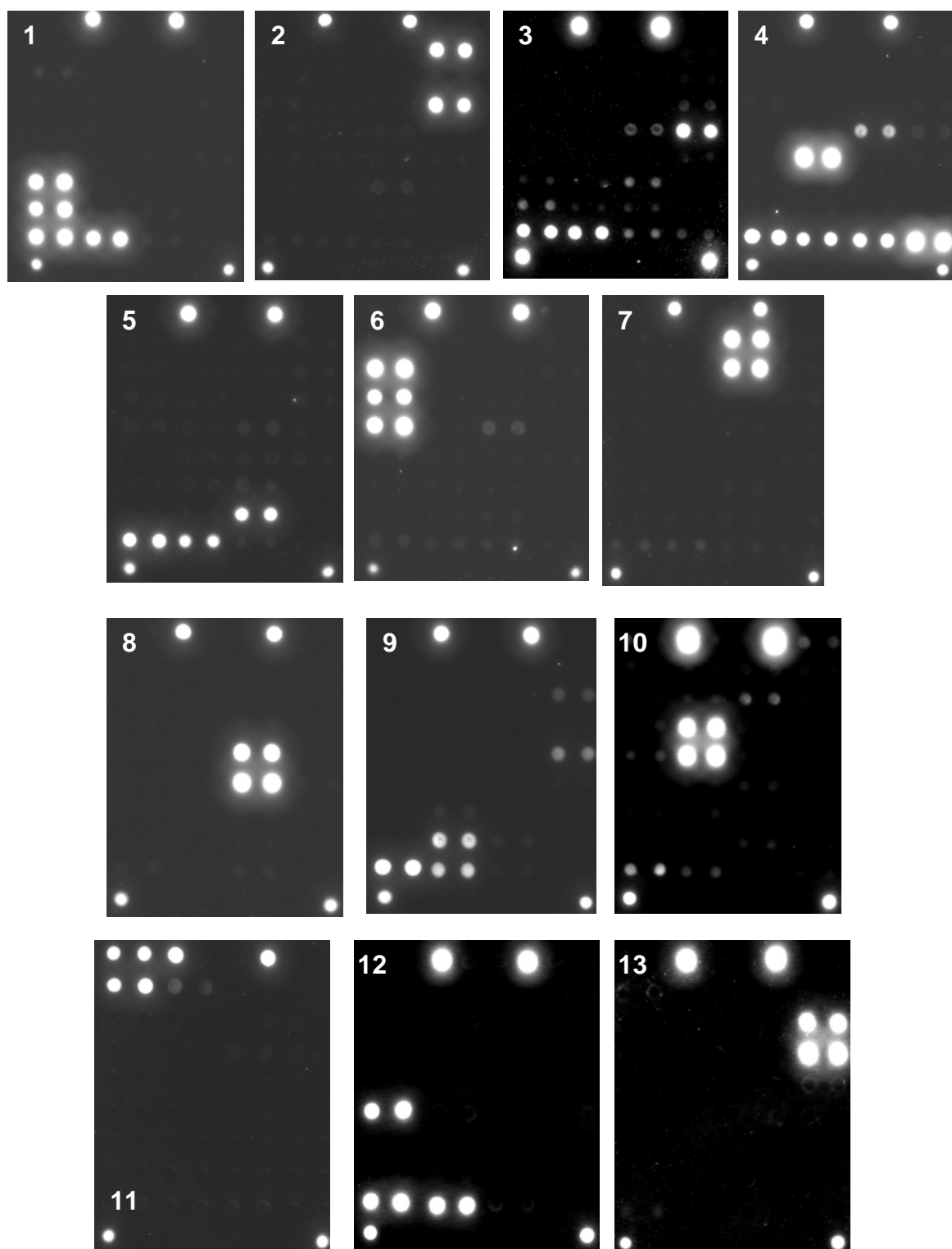


Рис. 4. Диалоговое окно режима 'Отчет'.



**Рис. 5** Варианты транслокаций, обнаруживаемые на ЛК биочипе.  
 1. Транслокация (4;11). Соответствует диагнозу ОЛЛ. В нижнем ряду может светиться больше, чем 4 ячейки, в зависимости от места разрыва в гене. 2. Транслокация (9;22). Соответствует диагнозу ХМЛ. Могут также светиться ячейки в самом верхнем ряду. 3. Транслокация (10;11), 3-е место слияния. 4. Транслокация (11;19) ENL. 5. Транслокация t(9;11), 1е место слияния. 6. Транслокация (15;17), место слияния bcr3. 7. Транслокация (1;19). 8. Транслокация (12;21), место слияния j1. 9. Транслокация (11;19) ELL. 10. Инверсия 16, место слияния j1. 11. Транслокация (8;21). 12. Транслокация (6;11). 13. Транслокация (9;22)p190.

## 9. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

9.1 Отсутствие гибридизационного сигнала для контрольного гена ABL в исследуемом образце РНК.

**Возможная причина:** плохое качество или низкая концентрация РНК, выделенной из образца пациента.

**Способ устранения:** повторить ПЦР I, используя для реакции 2 мкл кДНК в каждой пробирке, уменьшив при этом количество воды на 1 мкл (на 4 мкл в ПЦР смеси для 1 пациента). ПЦР II раунда провести без изменений.

9.2. Появление сигнала для более, чем одной транслокации или появление одной и той же транслокации у всех исследуемых больных, что превышает нормальную частоту встречаемости данной транслокации.

**Возможная причина:** загрязнение реагентов, расходных материалов или образца кДНК амплифицированным ПЦР-продуктом.

**Способ устранения:** В данном случае необходимо заменить все реагенты и повторить реакцию. Для работы с набором необходимо строго соблюдать правила работы в ПЦР лаборатории.

9.3. Несовпадение полученного результата с клинической картиной и диагнозом больного (наличие транслокации, несовместимой с диагнозом).

**Возможная причина:** ошибка в определении транслокации или неправильный диагноз.

**Способ устранения:** Если все контроли в наборе работают и исключена возможность загрязнения реагентов при амплификации, следует убедиться в том, что нет ошибки с диагнозом. Рекомендуется повторное исследование или проведение диагностики альтернативными методами (ОТ-ПЦР с последующим электрофорезом ПЦР-продуктов).

**Примечание:** При возникновении описанных проблем и неисправностей настоятельно рекомендуется контактировать с представителями предприятия-разработчика (присылать по электронной почте подробное описание проблемы с приложением гибридизационных изображений).

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

10.1. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при следующих условиях:

Комплект №1 хранят при температуре - 20<sup>0</sup>С.

Комплекты №№ 2 и 3 при комнатной температуре + 18<sup>0</sup>С + 25<sup>0</sup>С.

10.2. Срок годности набора - 6 мес.

10.3. Комплект № 1 можно хранить при температуре - 20<sup>0</sup>С не более 1дня.

10.4. Все реагенты после вскрытия флаконов и пробирок могут храниться не более 6 месяцев при условиях, указанных в пункте 9.1.

10.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам приобретения набора ЛК-БИОЧИП, а также за технической поддержкой обращаться в ООО «БИОЧИП-ИМБ» ([www.biochip.ru](http://www.biochip.ru)) по адресу: 117312, г. Москва, ул. Вавилова, 17,  
E-mail: [info@biochip.ru](mailto:info@biochip.ru)