**ПРОЕКТ**

КЛИНИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ МЕДИЦИНСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ, ХИМЕРНЫХ ТРАНСКРИПТОВ И ВАРИАНТОВ КОПИЙНОСТИ В КЛЮЧЕВЫХ 52 ГЕНАХ СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКОВЫХ ОПУХОЛЕЙ (МУЛЬТИГЕННАЯ ДИАГНОСТИКА) (ДИАГНОСТИКА МУТАЦИЙ В КЛЕТКАХ ОПУХОЛИ, ЗАКЛЮЧЕННЫХ В ПАРАФИНОВЫЙ СРЕЗ) МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ»**

1. **Вводная часть**

**1) код(ы) МКБ-10:**

|  |  |
| --- | --- |
| МКБ-10 | |
| Код | Название |
| C67 | Рак мочевого пузыря |
| C50 | Рак молочной железы |
| С18-С20 | Колоректальный рак |
| C15,C16 | Рак пищевода и желудка |
| C54 | Рак эндометрия |
| C71 | Глиобластома |
| C64 | Рак почек |
| C22 | Рак печени |
| C76 | Рак головы и шеи |
| C43-C44 | Меланома |
| C45 | Мезотелиома |
| C34 | Немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легкого |
| C41 | Остеосаркома |
| C56 | Рак яичников |
| C25 | Рак поджелудочной железы |
| C61 | Рак простаты |
| C73 | Рак щитовидной железы |

**2) дата разработки и пересмотра протокола:** 2021 год.

**3) сокращения, используемые в протоколе:**

NGS – next generation sequencing

SBS – секвенирование методом синтеза

НИОКР – Научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы

WES – секвенирование всего экзома

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

FISH – Флуоресцентная гибридизация in situ

RT-PCR – ПЦР в реальном времени

CNV - Гены вариаций количества копий

**4) пользователи протокола:** врачи по специальностям «Медицинская генетика», «Клиническая цитогенетика», «Клиническая молекулярная биология и генетика», «Онкология», «Онкология и гематология детская», «Онкология радиационная», «Онкология химиотерапевтическая», «Онкологическая хирургия», «Терапия», «Педиатрия», «Врач участковый и (или) врач общей практики».

**5) категория пациентов:** Пациенты (взрослые, дети), имеющие злокачественные новообразования (солидные опухоли): рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак пищевода и желудка, рак эндометрия, глиобластома, рак почек, рак печени, рак головы и шеи, меланома, мезотелиома, немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легкого, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак щитовидной железы.

**6) определение:** Молекулярно-генетический анализ мутаций, химерных транскриптов ивариантов копийности в ключевых 52 генах связанных с развитием раковых опухолей с использованием NGS технологии (таргетное секвенирование) позволяет одновременное обнаружение сотен вариантов по 52 генам, относящимся к солидным опухолям различной локализации. Это целенаправленный мульти-биомаркерный анализ, который позволяет обнаруживать горячие точки, SNV, инделы, CNV и слияния генов из ДНК и РНК в одном рабочем процессе.

Кратность применения: исследование проводится однократно, повторяется при клинической необходимости.

Техника проведения: применение секвенирования нового поколения (NGS технологии).

Критерии диагностики: наличие злокачественного новообразования.

Чувствительность: высокочувствительный метод, который включает от 100 до 130 млн прочтений пар нуклеотидов.

**7) клиническая классификация (наиболее распространенные подходы, по этиологии, стадии):**

**Классификация генов**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Гены, анализируемые для выявления вариантов последовательности ДНК (Горячие точки)** | | **Гены вариаций количества копий (CNVs)** | **Гибридные гены (fusion genes)** |
| 35 генов | | 19 генов | 23 генов |
| ДНК | | | РНК |
| AKT1 | JAK1 | ALK | ABL1 |
| ALK | JAK2 | AR | ALK |
| AR | JAK3 | BRAF | AKT3 |
| BRAF | KIT | CCND1 | AXL |
| CDK4 | KRAS | CDK4 | BRAF |
| CTNNB1 | MAP2K1 | CDK6 | EGFR |
| DDR2 | MAP2K2 | EGFR | ERBB2 |
| EGFR | MET | ERBB2 | ERG |
| ERBB2 | MTOR | FGFR1 | ETV1 |
| ERBB3 | NRAS | FGFR2 | ETV4 |
| ERBB4 | PDGFRA | FGFR3 | ETV5 |
| ESR1 | PIK3CA | FGFR4 | FGFR1 |
| FGFR1 | RAF1 | KIT | FGFR2 |
| FGFR2 | RET | KRAS | FGFR3 |
| FGFR3 | ROS1 | MET | MET |
| GNA11 | SMO | MYC | NTRK1 |
| GNAQ |  | MYCN | NTRK2 |
| HRAS |  | PDGFRA | NTRK3 |
| IDH1 |  | PIK3CA | PDGFRA |
| IDH2 |  |  | PPARG |
|  |  |  | RAF1 |
|  |  |  | RET |
|  |  |  | ROS1 |

**2. Методы, подходы и процедуры диагностики и лечения**

**1) цель проведения процедуры и вмешательства:**

Метод применяется для диагностики мутаций в клетках опухоли и назначения таргетной терапии. Выявление соматических мутаций у онкологических пациентов может существенно влиять на тактику их лечения, что окажет благоприятное влияние на прогноз заболевания. NGS также применим в области фармакогеномики с целью подбора персонифицированного лечения и прогнозирования возможных нежелательных реакций (гиперчувствительности) на прием некоторых лекарственных препаратов.

Метод применяется для идентификации новых мутаций для поиска новых генетических аберраций и связанных с ними потенциальных терапевтических мишеней для различных локализаций опухоли, а также для тестирования соматических мутаций.

**2) противопоказания к процедуре и вмешательству:** нет

**3) показания к процедуре и вмешательству:**

Пациенты, имеющие злокачественные новообразования (солидные опухоли).

**4) перечень основных и дополнительных диагностических мероприятий:** не требуется.

**5) требования к проведению процедуры и вмешательства (требования к соблюдению мер безопасности, санитарно-противоэпидемическому режиму), требования к оснащению, расходным материалам, медикаментам; требования к подготовке пациента (описание процесса подготовки пациента к проведению процедуры), а также непосредственная методика проведения процедуры (вмешательства):**

**Требования к соблюдению мер безопасности, санитарно-эпидемиологическому режиму:**

Меры безопасности и противоэпидемический режим согласно Санитарным правилам «Санитарно-эпидемиологические требования к объектам здравоохранения», утвержденным постановлением Правительства Республики Казахстан от 11 августа 2020 года № ҚР ДСМ-96/2020.

**Требования к оснащению лаборатории:**

Процедурные кабинеты по проведению молекулярно-генетического анализа мутаций должны быть оснащены следующим оборудованием:

* Автоматическая станция для выделения ДНК;
* Флуориметр;
* Центрифуга;
* Ламинарный шкаф;
* Проточный бактерицидный рециркулятор воздуха;
* Холодильник;
* Система количественной и цифровой ПЦР-РТ в комплекте с роботом для подготовки чипов;
* Термоциклер;
* Вортекс плашечный;
* Универсальный вортекс;
* Бокс для стерильных работ;
* Секвенатор;
* Термоциклер;
* Морозильная камера;
* Система для автоматизированной подготовки микросфер с ДНК.

**Требования к расходным материалам, медикаментам:**

- Материал для исследования: ткани опухоли, заключенные в парафиновый блок, фиксированный формалином (FFPE).

- Расходные материалы представлены в Таблице 1.

**Требования к подготовке пациента:**

Не применимо, так как в лабораторию поступают ткани опухоли, заключенные в парафиновый блок, фиксированный формалином (FFPE).

**Методика проведения процедуры**

1. ***Приготовление библиотеки***

Каждая реакция ПЦР-ОТ требует 10 нг общей РНК, обработанной ДНКазой (≥1.43 ng/μL). Измерить концентрацию РНК. Развести по формуле: C1V1=C2V2; V1=C2V2/C1. Составить таблицу расчета конц РНК и воды (значения в таблицу – разводим согласно ей, чтобы получить 10 нг и затем добавляем 1 мкл разведенного РНК при ОТ).

1. ***Реакция обратной транскрипции***:

1.1. РНК перед проведением ОТ-ПЦР разогреть на 80°С, охладить до комнатной температуры.

1.2 Рекомендуется проводить все шаги ПЦР на льду

1.3 Если в реакционной смеси, содержащей случайные праймеры, dNTP и MgCl2, есть осадок, перемешать на вортексе.

Приготовить пробирки на 0,2 мкл. Добавить следующие компоненты: реакционная смесь, содержащая случайные праймеры, dNTP и MgCl2 (2 µL); набор для синтеза кДНК (1 µL), РНК (10 нг, ≤ 7 µL), вода без нуклеазы (довести до 10 µL).

* 1. Закрыть крышку пробирки, вортексировать, центрифугировать 100 об/30 сек
  2. Поместить пробирки в амплификатор, выбрать необходимую программу для синтеза кДНК (Приложение 1). Пробы необходимо хранить 12-16 ч при температуре 10°C. При длительном хранении замораживать до -20°C.

Перед началом следующего шага пробирки центрифугировать 100 об/30 сек. Затем поставить на лед.

1. ***Реакция амплификации:***
   1. Так как смесь праймеров и Мастер-микс сборки ДНК вязкой консистенции, нужно медленно и тщательно перемешать пипетированием, кратко центрифугировать.

В пробирки с кДНК добавить следующие реагенты: комплект библиотеки (4 µL), библиотека для анализа целевого секвенирования следующего поколения (NGS) для выявления вариантов 52 генов, связанных с развитием раковых опухолей, из РНК (2 µL), вода без нуклеазы (4 µL).

* 1. Закрыть крышку, тщательно вортексировать, кратко центрифугировать.

2.3 Амплифицировать используя программу с подборкой циклов (Приложение 2).

Пробы хранить 12-16 ч при температуре 10°C. При длительном хранении замораживать до -20°C.

1. ***ДНК-таргетная амплификация***
   1. Рекомендуют использовать 10 нг геномного ДНК (300 копии) с высоким качеством. Концентрацию гДНК измерить флуориметром с применением набора реагентов для обнаружения РНКазы P.
   2. Приготовить пробирки на 0,2 мкл и добавить следующие компоненты: комплект библиотеки (4 µL), набор для анализа целевого секвенирования следующего поколения (NGS) для выявления вариантов 52 генов, связанных с развитием раковых опухолей, из ДНК (4 µL), ДНК (10 нг, ≤12 µL), и вода без нуклеазы (довести до 20 µL). Закрыть крышку. Вортексировать, кратко центрифугировать.
   3. Амплифицировать таргетные регионы с применением программы согласно Приложению 3.

Пробы хранить 12-16 ч при температуре 10°C. При длительном хранении замораживать до -20°C. Перед применением кратко центрифугировать.

* 1. Добавить реагент **FuPa** в каждую лунку по 2 μL. Общий объем довести до 22 μL.
  2. Плашку закрыть, тщательно вортексировать, кратко центрифугировать.
  3. Амплифицировать с использованием программы согласно Приложению 4. Кратко центрифугировать. При длительном хранении замораживать -20°C.

1. ***Лигирование адаптеров с ампликонами и очистка***
   1. При секвенировании нескольких библиотек на одном чипе необходимо лигировать разные адаптеры баркода для каждой библиотеки. ДНК и РНК одного пациента должны иметь разные бар-коды.

*Приготовление смеси для адаптера штрих-кода секвенирования геномного ДНК*

Для каждого выбранного штрих-кода X (1-16 или 17-32) подготовить смесь адаптера штрих-кода (2 µL) и штрих-кода Х (2 µL) при конечном разведении 1: 4 для каждого адаптера, добавить воду без нуклеазы (4 µL). Смесь вортексить, сбросить. Хранить при 20°C.

* 1. Если в реагенте Switch Solution после оттаивания есть осадок, перемешать на вортексе при комнатной температуре. Кратко центрифугировать.
  2. Осторожно снять пленку, затем добавить реагенты в следующей последовательности: Switch Solution (4 µL), смесь адаптеров штрих-кода (2 µL), ДНК-лигаза (2 µL). Закрыть крышку, тщательно вортексировать, кратко центрифугировать.
  3. Амплифицировать с использованием программы согласно Приложению 5.

1. ***Очистка библиотеки***
2. Приготовить 70% этанол перед использованием (350 μL × кол-во образца).
3. До использования реагент для очистки продуктов ПЦР тщательно вортексировать при комнатной температуре.
4. В чистые 1,5 мл пробирки внести 45 µL реагента для очистки продуктов ПЦР. Затем добавить 30 µL библиотеки. Тщательно перемешать суспензию ДНК и шариков пипеткой 5-10 раз. При визуальном осмотре суспензия должна быть гомогенной консистенции. Если капли попали на стенки нужно сбросить и заново пипетировать.
5. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
6. Поместить на магнитный штатив, затем инкубировать 2 минуты или до очищения раствора. Осторожно удалить супернатант, так, чтобы наконечник был строго перпендикулярно дну пробирки.
7. Добавить 300 µL 70% этанола, переставлять пробирку на 180°, так, чтобы шарики проходили сквозь раствор, затем инкубировать 2 минуты или до очищения раствора. Осторожно удалить супернатант.
8. Повторить шаг 6.
9. Убедиться, что этанол весь удален из лунки. Оставить плашку на магнитной поверхности и просушить при комнатной температуре 2-5 минуты. Не пересушить.
10. Убрать плашку с магнитной поверхности, затем добавить буфер Low TE 50 μL.
11. Закрыть плашку пленкой, тщательно вортексировать, кратко центрифугировать.
12. Инкубировать при комнатной температуре 2 минуты.
13. Поставить на магнитную поверхность на 2 минуты. Супернатант 47 μL собрать в 1.5-мл пробирку.

Библиотека хранится в течении 1 месяца при температуре 4-8°C, длительно при температуре -20°C

1. Приготовить 100х кратное разведение библиотеки:

2µL супернатанта + 198 µL воды без нуклеазы.

1. ***Секвенирование***

***Количественная оценка библиотеки кПЦР и вычисление коэффициента разбавления***

Определить концентрацию библиотеки с использованием набора для количественного анализа. Измерять каждую пробу, стандарт, отрицательный контроль.

1. Приготовить серии трех 10х кратно разведенных библиотеки контроля E. Coli (~68 pM): 6.8 pM, 0.68 pM, и 0.068 pM. Промаркировать как стандарт, затем использовать данные разведения для программирования прибора кПЦР.
2. Разведение E. Coli: Приготовить пробирки и подписать стандарт(S) 1,2,3.

В 1-ую + 45 мкл Н2О +5мкл E. Coli

Во 2-ую +45мкл Н2О + 5 мкл из 1-ой пробирки

В3-ю +45мкл Н2О +5мкл из 2-ой пробирки

1. Посчитать, затем приготовить ПЦР мастер микс на 3 лунки для каждой библиотеки образца, стандарта, NTC следуя данным таблицы в Приложении 6 (добавить 5-10%).
2. В плашку (оптическую ПЦР-пластину) в дублях добавить образец, стандарт, NTC следуя данным таблицы в Приложении 7.
3. Задать программу для ПЦР реал тайм согласно Приложению 8.
4. После кПЦР вычислить среднюю концентрацию неразбавленной библиотеки для анализа целевого секвенирования следующего поколения (NGS) для выявления вариантов 52 генов, связанных с развитием раковых опухолей, путем умножения концентрации × 100
5. Затем развести концентрацию до 50 рМ

Н-р: - концентрация неразведенной библиотеки составляет 300рМ

- коэффициент разбавления 300рМ/50рМ=6

- таким образом,

10 µL библиотеки +50 µL Low TE (1:6) = ~50 рМ

1. Объединить в один пул библиотеки в соотношении ***80:20 ДНК:РНК (8 µL библиотеки ДНК +2 µL библиотеки РНК)*** для секвенирования в одну 1.5-мл пробирку. Хранить при 4–8°C до 1 месяца, длительно при -20°C.

Число считывании (reads) 1 000 000 для ДНК, 250 000 для РНК.

Рекомендуется секвенировать до 7 образцов на один чип.

Обычный прогон анализа NGS производит ~3.5 × 106 считываний.

1. ***Биоинформационный анализ данных***

Полученные последовательности анализируются при помощи программного обеспечения. Только мутации, присутствующие по меньшей мере в 5% от общего числа считываний, проанализированных и наблюдаемых в обеих цепочках, рассматривались для мутационных вызовов (см. “Специально разработанная аналитическая чувствительность панели с несколькими генами” и “Специально разработанная аналитическая проверка панели с несколькими генами”).

Общая длительность проведения процедуры составляет 99 ч и проводится в несколько этапов.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование этапа | Краткое описание | Количество задействованнoго персонала | Длительность | Расходный материал |
| 1.Преаналитический | Выделение ДНК, РНК из парафиновых блоков, измерение концентрации полученных данных | Лаборант/врач-генетик | 6 часов | 1.Набор для выделения ДНК,РНК  2.Пробирка типа Eppendorf -10 шт  3.Наконечники:  1000 мкл – 5 шт  0-200 мкл – 10 шт  0-10 мкл – 5 шт  4.Наборы для измерения концентрации ДНК и РНК |
| Приготовление библиотеки (работа с образцами) для панельного секвенирования | Врач-генетик | 48 часов | 1.Набор для приготовления библиотеки  2.Пробирки с низкой адгезивностью - 10 шт  3.Пробирки 0-200 мкл – 40 шт  500 мкл - 20 шт.  2 мл – 40 шт  3.Наконечники:  1000 мкл – 96 шт  0-200 мкл –96 шт  0-10 мкл – 96 шт |
| Перенос готовых библиотек на биочипы  Процесс секвенирования - считывания полученной информации с биочипа и перенос данных в программное обеспечение | Врач-генетик | 20 часов | 1.Набор для приготовления библиотеки с помощью автоматической системы 2.Набор для панельного секвенирования  – 2 набора  3.Наконечники:  0-200 мкл – 12 шт  0-10 мкл – 12 шт |
| 2.Аналитический | Биоинформационный анализ полученных данных, работа с базами данных, лабораторная интерпретация полученных результатов\* | Врач-генетик | 1 день | Облачный сервис Applied Byosystems |
| 3.Постаналитический | Оформление и выдача результатов | Врач-генетик | 1 час | - |
| \*Клиническая интерпретация полученных данных производится отдельно врачом-генетиком на консультативном приеме | | | | |

**Таблица 1. Этапы проведения процедуры NGS.**

**7) индикаторы эффективности процедуры:**

Определение мутации для назначения таргетной терапии, соответствующей мутационному статусу опухоли.

# **3. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОТОКОЛА:**

**1) список разработчиков протокола с указанием квалификационных данных:**

1. Абильдинова Гульшара Жусуповна – д.м.н., профессор, врач-генетик высшей категории, руководитель персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
2. Жабакова Жанна Маратовна – врач-генетик второй категории персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
3. Шинтемирова Асель Асылбековна – врач-генетик второй категории персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
4. Нурпеисова Алтын Алданышовна – клинический фармаколог, начальник клинико-фармакологического отдела РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ.
5. Авдеев Андрей Владиславович – PhD, начальник отдела стратегического и инновационного развития РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ.
6. Ахметова Макпал Жапаровна – MPH, специалист отдела стратегического и инновационного развития РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ.

**2) указание на отсутствие конфликта интересов:** нет.

**3) указание условий пересмотра протокола:**

пересмотр протокола через 5 лет после его опубликования и с даты его вступления в действие или при наличии новых методов с уровнем доказательности.

**4) список использованной литературы:**

1. Cancer. Who.int. (2020). Retrieved 16 May 2020, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Fernandez, R., Carmona-Balea, A., Cuevas, C., Barrera, J., Kinnison, D., & Lamarque, J. et al. (2019). Modeling the Sources and Chemistry of Polar Tropospheric Halogens (Cl, Br, and I) Using the CAM‐Chem Global Chemistry‐Climate Model. *Journal Of Advances In Modeling Earth Systems*, *11*(7), 2259-2289. <https://doi.org/10.1029/2019ms001655>
3. Hiersch, L. (n.d.). Fetal Medicine (Third Edition) (3rd ed., pp. 254-262) (Y. Yaron, Ed.). Fetal Medicine (Third Edition). doi:doi.org/10.1016/B978-0-7020-6956-7.00026-9
4. Lee, A., Lee, S., Jung, C., Park, G., Lee, K., & Choi, H. et al. (2018). Use of the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel in clinical molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours: With emphasis on validation with relevant single molecular pathology tests and the Oncomine Focus Assay. *Pathology - Research And Practice*, *214*(5), 713-719. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.03.009>
5. Park, J., Yoo, H., Sul, H., Shin, S., Lee, S., & Kim, J. (2020). Genetic Characterization of Molecular Targets in Korean Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal Of Gastric Cancer*, *20*(1), 29. <https://doi.org/10.5230/jgc.2020.20.e2>
6. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., & Gastier-Foster, J. et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics In Medicine*, *17*(5), 405-423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
7. Tan, P., He, L., Cui, J., Qian, C., Cao, X., & Lin, M. et al. (2017). Assembly of the WHIP-TRIM14-PPP6C Mitochondrial Complex Promotes RIG-I-Mediated Antiviral Signaling. *Molecular Cell*, *68*(2), 293-307.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.035>
8. von Baumgarten, L., Kumbrink, J., Jung, A., Reischer, A., Flach, M., & Liebmann, S. et al. (2020). Therapeutic management of neuro-oncologic patients - potential relevance of CSF liquid biopsy. *Theranostics*, *10*(2), 856-866. <https://doi.org/10.7150/thno.36884>
9. Williams, H., Walsh, K., Diamond, A., Oniscu, A., & Deans, Z. (2018). Validation of the Oncomine™ focus panel for next-generation sequencing of clinical tumour samples. *Virchows Archiv*, *473*(4), 489-503. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2411-4>
10. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2018 год (статистические и аналитические данные), КазНИИОиР, Алматы 2019. <https://drive.google.com/file/d/1lXye8lkJRg7G8Tn96gjGoI3brv4buv6e/view>

***Приложение 1***

|  |  |
| --- | --- |
| Температура | Время |
| 42°C | 30 мин |
| 85°C | 5 мин |
| 10°C | - |

**Таблица 2. Программа для синтеза кДНК.**

***Приложение 2***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Этап | Шаг | | Температура | Время |
| - | Активация фермента | | 99°C(98) | 2 мин |
| Цикл (**30**) | Денатурация | | 99°C(98) | 15 сек |
| Отжиг | | 60°C | 4 мин |
| - | - | | 10°C | - |
| Тип РНК | | Рекомендуемое кол-во циклов (10нг) | Регулируемое кол-во циклов | |
| 1 нг РНК | 100 нг РНК |
| РНК высокого качества | | 27 | +3 | -3 |
| РНК из парафинового блока | | 30 | +3 | -3 |

**Таблица 3. Программа для амплификации кДНК.**

***Приложение 3***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Этап | Шаг | Температура | Время |
| - | Активация фермента | 99°C | 2 мин |
| Цикл (**20**) | Денатурация | 99°C | 15 сек |
| Отжиг | 60°C | 4 мин |
| - | - | 10°C | - |

**Таблица 4. Программа для ДНК-таргетной амплификации.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Тип ДНК | Рекомендуемое кол-во циклов (10нг) | Регулируемое кол-во циклов | |
| 1 нг РНК | 100 нг РНК |
| ДНК высокого качества | 17 | +3 | -3 |
| ДНК из парафинового блока | 20 | +3 | -3 |

**Таблица 5. Схема регулирования циклов при процессе амплификации ДНК.**

***Приложение 4***

|  |  |
| --- | --- |
| Температура | Время |
| 50°C | 10 мин |
| 55°C | 10 мин |
| 60°C | 20 мин |
| 10°C | - ( в течении 1 ч) |

**Таблица 6. Программа для амплификации ДНК.**

***Приложение 5***

|  |  |
| --- | --- |
| Температура | Время |
| 22°C | 30 мин |
| 68°C | 5 мин |
| 72°C | 5 мин |
| 10°C | - (в течении 24 ч) |

**Таблица 7. Программа для амплификации ДНК.**

***Приложение 6***

|  |  |
| --- | --- |
| Реагент | Кол-во на 96-лун. плашку |
| 2X мастер микс | 10 µL |
| 20X реагента количественного анализа | 1 µL |
| Всего | 11 µL |

**Таблица 8. Список реагентов для приготовления ПЦР мастер микс.**

***Приложение 7***

|  |  |
| --- | --- |
| Реагент | Кол-во на 96-лун. плашку |
| PCR Master Mix | 11 µL |
| 1:100 разбавление пробы (образец) | 9 µL |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| А |  | DNA\_S1 | DNA\_S1 |  | NTC | NTC | NTC |  |  |  |  |  |
| B |  | DNA\_S2 | DNA\_S2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C |  | DNA\_S3 | DNA\_S3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D |  | DNA\_ | DNA\_ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E |  | DNA\_ | DNA\_ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F |  | DNA\_ | DNA\_ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G |  | DNA\_ | DNA\_ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H |  | DNA\_ | DNA\_ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Таблица 9. Схема распределения образца по лунным плашкам.**