

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»
Л.М. Халилова
(по доверенности №95/01 от 30 декабря 2022)
«25» августа 2023 г.



КРАТКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

**к набору реагентов для определения статуса мутаций
генов BRCA1 и BRCA2 методом массового
параллельного секвенирования в пробе геномной ДНК
человека «Quasar-BRCA1/2»
по ТУ 21.20.23-038-97638376-2020**

1. Измерение концентрации ДНК

Для ДНК, выделенной из **крови**, рекомендуется метод измерения концентрации с использованием флуориметров **Qubit** (Thermo Fisher Scientific), или аналогичных.

Для ДНК, выделенной из **FFPE-блоков**, рекомендуется метод измерения концентрации с использованием ПЦР-РВ: набор реагентов «**Quasar Red**» (производство ООО «ТестГен») или аналоги. Допускается использование метода измерения концентрации с использованием Qubit.

Измерение концентрации ДНК с использованием Qubit.

Для измерения концентрации используются тонкостенные оптически прозрачные пластиковые пробирки на 0,5 мл.

1. Для измерения концентрации с использованием Qubit необходимо предварительно приготовить 1х ТЕ буфер в соответствии с инструкцией производителя.
2. Приготовить мастер-микс для измерения с запасом. Не хранить краситель и мастер-микс на свету. На каждое измерение используется по 400 мкл мастер-микса для измерения 2 стандартных образцов. Объем мастер-микса учитывает расход на измерение стандартов.

Приготовление мастер-микса:

Реагент	На 1 образец	На 48 образцов	На 96 образцов
1х ТЕ буфер	600 мкл	10 мл	20 мл
Краситель	3 мкл	50 мкл	100 мкл

3. Разнести по 190 мкл мастер-микса в пробирки на 0,5 мл для стандартов.
4. Добавить по 10 мкл Стандарта 1 и Стандарта 2 в соответствующие пробирки. Перемешать на вортексе и кратко центрифугировать.
5. Разнести по 198 мкл в пробирки на 0,5 мл для образцов.

6. Добавить по 2 мкл образцов в соответствующие пробирки. Перемешать на вортексе и кратко центрифугировать.
7. Инкубировать пробирки 5 минут при комнатной температуре.
8. Измерить концентрацию с помощью флуориметра Qubit, следуя инструкции производителя.

2. Разведение ДНК

ДНК из крови, измеренная на Qubit, или ДНК из блоков, измеренная методом ПЦР:

- Концентрация менее 1 нг/мкл – требуется повторное выделение.
- Концентрация от 1 до 12 нг/мкл:

$$V_{DNA} (\text{объем ДНК}) = \frac{12 \text{ нг}}{\text{концентрация ДНК нг/мкл}}$$

$$V_{mQ} (\text{объем } mQ) = 12 \text{ мкл} - V_{DNA} (\text{объем ДНК})$$

- Концентрация более 12 нг/мкл:

$$V_{DNA} (\text{объем ДНК}) = 1 \text{ мкл}$$

$$V_{mQ} (\text{объем } mQ) = \text{концентрация ДНК нг/мкл} - 1$$

ДНК из блоков, измеренная на Qubit:

- Концентрация менее 1 нг/мкл – требуется повторное выделение.
- Концентрация от 1 до 3 нг/мкл – желательно повторное выделение, результат может быть сомнительным.

$$V_{DNA} (\text{объем ДНК}) = \frac{12 \text{ нг}}{\text{концентрация ДНК нг/мкл}}$$

$$V_{mQ} (\text{объем } mQ) = 12 \text{ мкл} - V_{DNA} (\text{объем ДНК})$$

- Концентрация от 3 до 36 нг/мкл:

$$V_{DNA} (\text{объем ДНК}) = \frac{36 \text{ нг}}{\text{концентрация ДНК нг/мкл}}$$

$$V_{mQ} (\text{объем } mQ) = 12 \text{ мкл} - V_{DNA} (\text{объем ДНК})$$

- Концентрация более 36 нг/мкл:

$$V_{DNA} (\text{объем ДНК}) = 1 \text{ мкл}$$

$$V_{mQ} (\text{объем } mQ) = \frac{\text{концентрация ДНК нг/мкл}}{3 \text{ нг/мкл}} - 1$$

3. Целевая мультиплексная ПЦР-амплификация ДНК

Общий объем реакции – 20 мкл.

1. Подготовить мастер-микс с запасом. ПЦР-буфер-1 не оставлять надолго в тепле.

Приготовление мастер-микса:

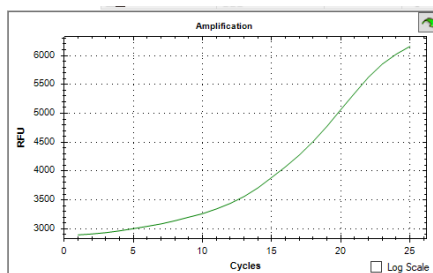
Реагент	На 1 образец	На 48 образцов	На 96 образцов
ПЦР-буфер-1	4 мкл	200 мкл	400 мкл
Праймер-микс-QB	4 мкл	200 мкл	400 мкл

2. Разнести по 8 мкл мастер-микса в пробирки на 200 мкл, стрипы или плашки.
3. Внести по 12 мкл разведенной ДНК.
4. Закрыть крышки ПЦР-пробирок или заклеить ПЦР-планшет плёнкой.
5. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки или ПЦР-планшет в течение 1-3 секунд на центрифуге.
6. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой. Возможно использование прибора ПЦР без детекции сигнала в режиме реального времени.
7. Запустить следующую программу амплификации:

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00	-	1
2	95	01:00	-	5
	61	04:00		
	63	02:00		
	66	01:00		
3	95	00:30	-	25
	72	03:00	FAM/Green	
4	8	постоянно	-	1

8. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой. Указать детекцию флуоресцентного сигнала SYBR/FAM/Green (при возможности), соблюдая инструкцию для используемого прибора и **отключить** режим автоматической базовой линии.
9. Ампликоны можно хранить при -20 °C в течение 30 дней.

Типичный вид графика нарастания флуоресценции: вогнутая дугообразная кривая флуоресценции.



4. Очистка целевых ампликонов

1. Подготовить суспензию магнитных частиц с запасом. Ресуспендировать Частицы-1 перед добавлением.

Приготовление мастер-микса:

Реагент	На 1 образец	На 48 образцов	На 96 образцов
Растворитель-1	20 мкл	1 мл	2 мл
Частицы-1	40 мкл	2 мл	4 мл

- Интенсивно перемешать смесь (можно использовать вортекс). Готовую смесь частиц хранить в холодильном отделении при +4 °С не более 1 дня, **НЕ замораживать!**
2. В каждую пробирку с анализируемым образцом внести по 60 мкл смеси.
 3. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин при комнатной температуре в штативе «рабочее место».
 4. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирки или планшет на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках или лунках планшета не станет прозрачной.
 5. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить п. 4-5.
 6. Добавить в пробирки или лунки планшета по 180 мкл 70% этанола.
 7. Поместить пробирки или планшет с реакционной смесью на магнитный штатив и инкубировать 1 мин при комнатной температуре. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить этот шаг.

8. Повторить пп. 6-7 еще 1 раз. Таким образом, проводится 2 промывки целевых ампликонов 70% этанолом.
9. Удалить остатки этанола тонким наконечником.
10. Просушить магнитные частицы при комнатной температуре 2 мин, не вынимая пробирку или планшет из магнитного штатива, для удаления остаточного спирта.
11. Добавить к осадку магнитных частиц 100 мкл деионизованной воды mQ для элюции, хорошо перемешать на вортексе до гомогенизации суспензии. Скинуть капли коротким центрифугированием.
12. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин при комнатной температуре в штативе «рабочее место».
13. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирки или планшет на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках или лунках планшета не станет прозрачной. В супернатанте содержатся очищенные ампликоны. Сразу перейти к следующему этапу!

5. Индексирование ампликонов

Общий объем реакции – 50 мкл.

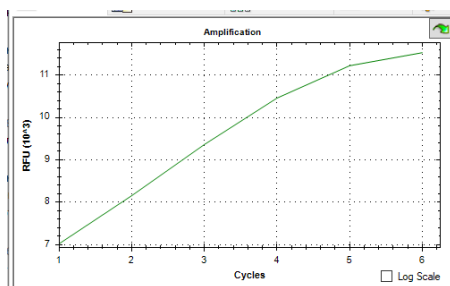
1. Внести в каждую пробирку по 10 мкл ПЦР-буфера-2 (ПЦР-буфер-2 не оставлять надолго в тепле!).
2. Внести 30 мкл выбранной смеси индексов из лунок планшета в каждую пробирку. В один образец вносится одна смесь индексов.
3. Внести в соответствующие пробирки 10 мкл очищенного ампликона из этапа 4.13. Остаток раствора ампликона вместе с магнитными частицами может храниться при -20 °С в течение 30 дней. *После замораживания магнитные частицы не могут использоваться для переосаждения ДНК!*
4. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки в течение 1-3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

5. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой. Возможно использование прибора ПЦР без детекции сигнала в режиме реального времени.
6. Запустить следующую программу амплификации:

Стадия	Температура, °С	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	03:00	-	1
2	95	00:30	-	3
	66	00:30		
	72	02:00		
3	95	00:30	-	6
	72	02:00	FAM/Green	
4	72	05:00	-	1
5	8	постоянно	-	1

7. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой. Указать детекцию флуоресцентного сигнала SYBR/FAM/Green (при возможности), соблюдая инструкцию для используемого прибора и **отключить** режим автоматической базовой линии.
8. Ампликоны можно хранить при -20 °С в течение 30 дней
9. **Опционально!** Измерить концентрацию ДНК нескольких ампликонов. Рекомендуется измерение концентрации с использованием флуориметров Qubit.
Средняя концентрация ампликонов должна быть 30-40 нг/мкл. Допускается отклонение в 1,5-2 раза между образцами.

Типичный вид графика нарастания флуоресценции: выпуклая дугообразная кривая флуоресценции с накоплением.



6. Смешивание и очистка целевых ДНК-библиотек

1. В новой пробирке смешать по 10 мкл каждого индексированного образца из крови или 30 мкл каждого индексированного образца из блоков из этапа 5.8. Хорошо перемешать на вортексе и кратко центрифугировать.
2. В новую пробирку 0.2 мл отобрать аликвоту 20 мкл смеси.
3. Добавить к аликвоте 20 мкл Растворителя-2 и 26 мкл ресуспендированных Частиц-2 комнатной температуры, перемешать пипетированием
4. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин при комнатной температуре в штативе «рабочее место».
5. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирки или планшет на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках или лунках планшета не станет прозрачной.
6. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить п. 5-6.
7. Добавить в пробирки или лунки планшета по 180 мкл 70% этанола.
8. Поместить пробирки или планшет с реакционной смесью на магнитный штатив и инкубировать 1 мин при комнатной

- температуре. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить этот шаг.
9. Повторить пп. 7-8 еще 1 раз. Таким образом, проводится 2 промывки целевых ампликонов 70% этанолом.
 10. Удалить остатки этанола тонким наконечником.
 11. Просушить магнитные частицы при комнатной температуре 2 мин, не вынимая пробирку или планшет из магнитного штатива, для удаления остаточного спирта.
 12. Добавить к осадку магнитных частиц 22 мкл деионизованной воды mQ для элюции, хорошо перемешать на вортексе до гомогенизации суспензии. Скинуть капли коротким центрифугированием.
 13. Инкубировать пробирки или планшеты 2 мин при комнатной температуре в штативе «рабочее место».
 14. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирку на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирке не станет прозрачной.
 15. Отобрать 20 мкл супернатанта в новые пробирки для ПЦР. Готовую библиотеку можно хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 дней.
 16. Добавить 16 мкл ресуспендированных Частиц-2 комнатной температуры, перемешать пипетированием.
 17. Инкубировать пробирки или планшеты 2 мин. при комнатной температуре в штативе «рабочее место».
 18. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирки или планшеты на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках или лунках планшета не станет прозрачной.
 19. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы

- были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить п. 18-19
20. Добавить в пробирки или лунки планшета по 180 мкл 70% этанола.
 21. Поместить пробирки или планшет с реакционной смесью на магнитный штатив и инкубировать 1 мин. при комнатной температуре. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить этот шаг.
 22. Повторить пп. 20-21 еще 1 раз. Таким образом, проводится 2 промывки целевых ампликонов 70% этанолом.
 23. Удалить остатки этанола тонким наконечником.
 24. Просушить магнитные частицы при комнатной температуре 2 мин, не вынимая пробирку или планшет из магнитного штатива, для удаления остаточного спирта.
 25. Добавить к осадку магнитных частиц 20 мкл деионизованной воды mQ для элюции, хорошо перемешать на вортексе до гомогенизации суспензии. Скинуть капли коротким центрифугированием.
 26. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин. при комнатной температуре в штативе «рабочее место».
 27. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирку на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирке не станет прозрачной.
 28. Отобрать 18 мкл супернатанта в новую пробирку 0,2 мл. В супернатанте содержится единая очищенная ДНК-библиотека для секвенирования (содержит все ранее смешанные ДНК-библиотеки анализируемых образцов).
 29. Измерить концентрацию ДНК-библиотеки. Рекомендуется метод измерения концентрации с использованием флуориметров Qubit. Рекомендуется использовать 2 мкл образца на измерение для уменьшения ошибок

аликвотирования. Концентрация библиотеки должна составлять 3-7 нг/мкл

30. Отобрать аликвоту 5 мкл ДНК-библиотеки и добавить воды mQ до конечной концентрации 4 нМ. Разведенную библиотеку не рекомендуется хранить. Для расчёта количества добавляемой воды mQ воспользуйтесь формулой ниже:

$$V_{mQ} = 5.4 \cdot C_{\text{библ}} - 5$$

V_{mQ} – объем добавляемой mQ

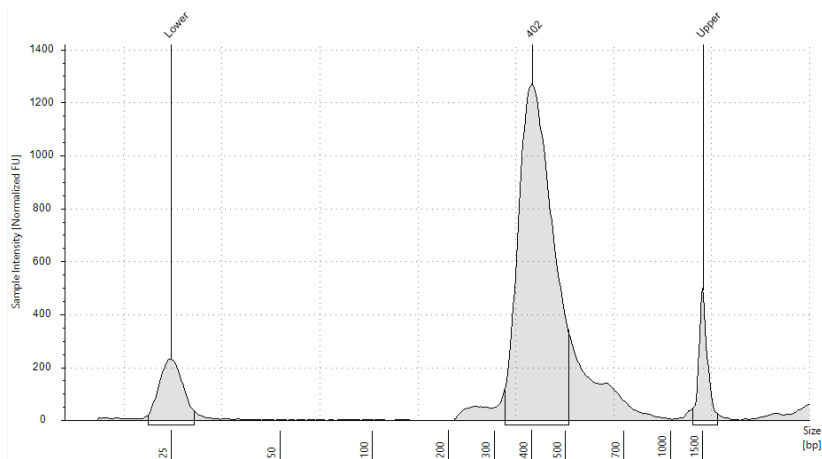
$C_{\text{библ}}$ – измеренная концентрация библиотеки (в нг/мкл)

Концентрация 0,92 нг/мкл соответствует молярности 4 нМ.

7. Проведение капиллярного электрофореза

Перед секвенированием готовой ДНК-библиотеки рекомендуется всегда проводить оценку ее качества с использованием капиллярного гель-электрофореза. Например, на Agilent TapeStation или BioAnalyzer. При использовании данного оборудования рекомендуется использовать наборы высокой чувствительности (High Sensitivity, HS), анализирующие ДНК в размере длин 35-1000 п.о.

Типичный вид кривой представлен на рисунке ниже. Фракция длиной 300-700 п.о. должна составлять не менее 90% площади кривой (Integrated Area), а фракция длины 100-200 п.о. - не более 5-7%. В случае большей доли фракции длины 100-200 п.о. секвенирование библиотеки не рекомендуется, так как это приведет к превалированию несмысловой ДНК в данных сиквенса (димеров). Для получения рекомендаций по работе с такими библиотеками свяжитесь со службой технической поддержки «ТестГен».



8. Массовое параллельное секвенирование

Убедитесь, что на секвенаторе Illumina MiSeq установлен программный модуль GenerateFastq. В случае необходимости, скачайте и установите его с сайта компании Illumina.

1. Приготовить свежий раствор 0,2М NaOH.
2. В пробирке объемом 1,5 мл смешать 5 мкл ДНК-библиотеки с концентрацией 4 нМ и 5 мкл 0,2М NaOH.
3. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирку в течение 1–3 секунд на центрифуге-вортексе.
4. Инкубировать смесь 5 минут при комнатной температуре.
5. Добавить в пробирку 1100 мкл охлажденного до +4 °С буфера HT1, входящего в состав Набора для секвенирования Illumina MiSeq Reagent Kit v3. Итоговый раствор ДНК-библиотеки для секвенирования имеет концентрацию 18 пМ.
6. Взять заранее размороженный и перемешанный картридж с реактивами Illumina MiSeq. Пипеткой с чистым наконечником на 1 мл проколоть крышку из фольги, покрывающую емкость с этикеткой Load Samples (Загрузка образцов). Выкинуть наконечник!

7. Отобрать 600 мкл подготовленной библиотеки (п. 7.5) и внести в емкость с этикеткой Load Samples (Загрузка образцов), не касаясь фольги.
8. Заполнить Sample Sheet, указав список образцов и последовательности индексов QR7 и QR5. Для анализа требуется проведения секвенирования в формате 2x150 п.о. с прочтением двух индексов по 8 п.о. (i7/i5)
9. Далее следовать инструкции производителя для секвенатора Illumina MiSeq по загрузке картриджа и запуску секвенирования.