

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов **BCR-ABL MutaPrime RQ Kit, 24 теста** для выявления мутации T315I тирозинкиназного домена химерного гена *BCR-ABL1* в клиническом материале пациентов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Совместимы с амплификаторами: «iQ5» (Bio-Rad); «CFX96» (Bio-Rad); «ABIPrism» (ThermoFisher Scientific); «Lightcycler» (Roche); «Rotor-Gene» 3000/6000 (Corbett Research/Qiagen).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Появление ингибиторов тирозинкиназ (иматиниба) стало переломным моментом в терапии хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ). Однако некоторые пациенты либо рефрактерны к иматинибу, либо, в конечном счете, рецидивируют. Подобная резистентность часто ассоциирована с мутациями в киназном домене химерного гена *BCR-ABL1*, характерного для ХМЛ. У пациентов с ХМЛ и позитивным по филадельфийской хромосоме острым лимфобластным лейкозом (Ph+ОЛЛ), резистентных к терапии иматинибом, было обнаружено около ста точечных мутаций, обуславливающих замену единичной аминокислоты в *BCR-ABL1*. Часть этих мутаций затрагивает участки связывания иматиниба с химерной тирозинкиназой *BCR-ABL1*. Другие мутации влияют на регуляторные участки киназного домена, что приводит к уменьшению чувствительности к иматинибу и aberrантной киназной активности. Ранняя детекция мутаций *BCR-ABL1* позволяет выбрать вторую линию терапии. В частности пациенты с мутацией T315I резистентны ко всем применяемым ингибиторам тирозинкиназ, и терапией выбора является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Набор реагентов может быть использован для выявления мутации T315I тирозинкиназного домена химерного гена *BCR-ABL1* в клиническом материале пациентов с хроническим миелоидным лейкозом и Ph+ острым лимфобластным лейкозом методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», а также для мониторинга эффективности терапии - оценки минимальной остаточной болезни (MRD).

Набор предназначен для использования исключительно в исследовательских целях.

СОСТАВ НАБОРА

Комплект реагентов «**BCR-ABL MutaPrime RQ Kit, 24 теста**» включает:

Реактив		Описание	Объем (мкл)	Кол-во	
ДНК-контроли	MUT BCR-ABL	T315I	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
	BCR-ABL	M BCR-ABL	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
Синтетические олигонуклеотиды	MUT BCR-ABL	Primer Mix BCR-ABL T315I	Прозрачная окрашенная жидкость	60	1 пробирка
	BCR-ABL	PrimerMix BCR-ABL	Прозрачная окрашенная жидкость	60	1 пробирка
ПЦР Мастер-микс для 1 раунда ПЦР		PCR Mix 1	Прозрачная бесцветная жидкость	215	1 пробирка
ПЦР Мастер-микс для 2 раунда ПЦР	PCR Mix 2	Прозрачная бесцветная жидкость	695	2 пробирки	
Вода качества mQ	Water	Прозрачная бесцветная жидкость	745	2 пробирки	

ДНК-контроли – представляют собой препараты плазмид, содержащих вставку кДНК, несущую мутантную форму *BCR-ABL1* (T315I) или форму *BCR-ABL1* дикого типа (M BCR-ABL). Используются в качестве положительного качественного контроля ПЦР для PCR Mix 2.

Результат амплификации кДНК регистрируется по каналу флуоресценции Green/FAM.

ВЫПОЛНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы необходимо хранить при температуре - 20°C.

1. Перед началом работы разморозьте реактивы при комнатной температуре (в течение 15-30 мин). Перед применением реактивов убедитесь, что кристаллы льда полностью растаяли;
2. Тщательно перемешайте все компоненты реакции, осадите капли с помощью настольной центрифуги - 10 сек при 1000 g (quick spin);

3. Постановка реакции первого раунда ПЦР:

Компонент набора	ПЦР-смесь, объем (мкл)		
	Из расчета на 1 реакцию	Из расчета на 13 реакций (12 проб пациентов)	Из расчета на 13 реакций (10 проб пациентов с учетом возможной погрешности дозатора)
Water	4,2	54,6	58,8
PCR Mix 1	7,8	101,4	109,2

4. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавьте 3 мкл образца кДНК в пробирку с реакционной смесью. Реакция первого раунда ПЦР ставится в 1 повторе для каждой пробы кДНК пациента. Общий объем реакционной смеси составляет 15 мкл;

5. Поместить ПЦР-пробирки в амплификатор. Запрограммировать прибор для выполнения следующей программы амплификации:

Этап	Температура, °C	Время	Повторов
Hold	95	10 мин	1
Cycling	95	10 с	40
	60	30 с	
	72	1 мин 30 с	
Hold	72	10 мин	1
Hold	10	∞	1

6. Развести полученный ПЦР-продукт водой качества MQ (прилагается к набору) в зависимости от отношения копияности *BCR-ABL1/ABL1* в пробах кДНК пациентов согласно следующей таблице, хорошо перемешав продукт ПЦР 1 раунда на вортексе:

Отношение копий <i>BCR-ABL1/ABL1</i> в пробе кДНК пациента	Разведение	Примечание
0,01>0,1	В 2 раза	К 2,5 мкл ПЦР-продукта 1 раунда добавить 2,5 мкл воды качества MQ
0,1>1	В 5 раз	К 1 мкл ПЦР-продукта 1 раунда добавить 4 мкл воды качества MQ
<1	В 100 раз	Произвести последовательное десятичное разведение ПЦР продукта 1 раунда: сначала в 10 раз (1 мкл продукта 1 раунда + 9 мкл воды), затем еще в 10 раз (1 мкл первого десятичного разведения + 9 мкл воды, при необходимости повторить)

7. Постановка реакции 2 раунда ПЦР:

NB! Следует перемешивать на вортексе все компоненты реакции перед добавлением в реакционную смесь. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Реакция ставится в двух повторах для мутации T315I и для M BCR-ABL для каждого пациента. Также для каждого микса синтетических олигонуклеотидов рекомендуется ставить по одной контрольной реакции без добавления матрицы (NTC control).

Компонент набора	ПЦР-смесь T315I, объем (мкл)	ПЦР-смесь M BCR-ABL, объем (мкл)
PrimerMix BCR-ABL T315I	1	-
PrimerMix BCR-ABL	-	1
PCR Mix 2	12,5	12,5
H2O	6,5	6,5
Разведенный ПЦР-продукт 1 раунда	5	5

8. Поместите микропробирки в амплификатор;
9. Запрограммируйте прибор для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (**общий объем реакции составляет 25 мкл**):

Таблица 1. Программа амплификации для термоциклеров «iQ iCycler» (Bio-Rad), «CFX96» (Bio-Rad) и «Quantstudio» (Applied Biosystems)

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во повторов
Hold	50	2 мин	-	1
Hold	95	10 мин	-	1
	95	15 с	-	45
Cycling	60	60 с	FAM	

Таблица 2. Программа амплификации для «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Повторов
Hold	50	2 мин	-	1
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	10 с	-	43
	60	50 с	Green	

АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией к прибору.
- Относительную экспрессию мутантной формы BCR-ABL для каждой мутации следует рассчитать по формуле:

$$BCRABL(MUT) = \frac{1}{2^{\Delta(Ct_{mut} - Ct_{MBCRABL})}}, \text{ где}$$

Ct mut – среднее значение Ct для повторов каждой мутации

Ct M BCRABL – среднее значение Ct для повторов M BCRABL в каждой пробе

- Результат следует считать отрицательным, если относительный уровень экспрессии мутантной формы BCR-ABL составляет ≤1.**

КРИТЕРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Критерий	Допустимые значения/результаты
Отклонение Ct между повторами	≤ 2 (при среднем значении Ct >36) ≤ 1,5 (при среднем значении Ct ≤36)
Отрицательные контроли без добавления матрицы (NTC)	Не должны детектироваться. <i>Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.</i>
Положительные ДНК-контроли	Должны детектироваться

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Дополнительную информацию можно получить в следующих источниках:

- Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood. 2011 Aug 4;118(5):1208-15.
- Ernst T, La Rosée P, Müller MC, Hochhaus A. BCR-ABL mutations in chronic myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2011 Oct;25(5):997-1008
- Gabert J, Beillard E et al. Standardization and quality control studies of real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2318-57.
- van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia 17, 1013.
- Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. Leukemia 17, 2474.

Принцип метода:

Метод выявления мутаций киназного домена BCR-ABL1 основан на двухраундной вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов второго раунда в режиме «реального времени». Первый раунд ПЦР проводится на обычном ПЦР-термоциклере. Далее продукт первого раунда используется в качестве матрицы для осуществления второго раунда ПЦР, где используются аллель-специфичные праймеры для мутации T315I и TaqMan зонд, способный гибридизоваться с матрицей между двумя праймерами. Зонд

мечен флуорофором (FAM - 6-карбоксихлорофлуоресцеин) на 5'-конце и поглощающим гасителем BHQ (Black Hole Quencher) на 3'-конце. До тех пор, пока зонд интактен, эмиссия одного красителя гасится вторым за счет резонансного переноса энергии. В ходе ПЦР ДНК-полимераза, дойдя до локуса, с которым связан TaqMan-зонд, разрушает последний за счет присущей ей 5'-3' экзонуклеазной активности. В результате чего происходит разобщение красителя и гасителя на концах зонда и прекращение действия эффекта резонансного переноса энергии. После этого флуоресценция красителя может быть зафиксирована при помощи детектора. Результат амплификации мутации T315I в BCR-ABL1 второго раунда детектируются по каналу FAM. **В анализ берутся пробы кДНК пациентов с ХМЛ или Ph+ОЛЛ с отношением копийности BCR-ABL1/ABL1 более 0,01.**

Отбор и хранение образцов

1. Образец крови или костного мозга с ЭДТА. Материал помещают в пробирку типа Vacutainer (BD) с 6% раствором ЭДТА. Закрытую пробирку несколько раз переворачивают.

Для отбора клеток:

а) пробирку с кровью или костным мозгом центрифугируют в течение 20 мин при 800-1600 об/мин при комнатной температуре не позднее 48 часов с момента взятия крови (при условии хранения цельной крови при температуре от + 2 до + 6°C). Все белые клетки крови (белая пленка на поверхности отстоявшейся эритроцитарной массы) аккуратно отбирают (до общего объема образца 200 мкл, захват эритроцитов и плазмы допустимы) и немедленно помещают в TriZ Reagent (кат. Номер IG-TRZ-100, Inogene, Россия). Данный образец допускается хранить до обработки при температуре не выше - 68°C в течение 1 года.

б) Образец крови или костного мозга обрабатывают лизирующим эритроциты реагентом для лизиса эритроидных клеток. Для этого к 2,5 мл цельной крови добавляют 7,0 мл реагента, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 3 тыс. об/мин. Супернатант отбирают, не задавая осадка. В дальнейшем выполняется выделение РНК согласно инструкции производителя – с использованием лизирующего реагента при колоночном методе выделения (QIAamp RNA Blood Mini Kit (50) (Cat No. 52304, Qiagen, Германия) или TriZ реагента.

2. Образец с РНК-стабилизатором. Образец материала пациента в объеме 2,5 мл помещают в пробирку с РНК-стабилизатором (например PAXgene (PreAnalytiX)). Закрытую пробирку с несколько раз переворачивают. Допускается хранение данного образца в течение двух суток при температуре 25°C или 4 суток при температуре 4 °C.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Оборудование:

- Real-Time амплификатор («iQ5» (Bio-Rad); «CFX96» (Bio-Rad); «ABIPrism» (ThermoFisher Scientific); «Lightcycler» (Roche); «Rotor-Gene» 3000/6000 (Corbett Research/Qiagen).
- Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C;
- Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- Холодильник от + 2 до + 8 °C, морозильная камера не выше - 16 °C для реагентов и выделенных ДНК;

Варианты наборов реагентов для стабилизации РНК:

- Blood RNA stabilizer (Cat No. IG-RSB-100, Inogene, Россия)
- PAXgene Blood RNA Tubes (Cat No. 764114, Qiagen, Германия)

Варианты наборов реагентов для выделения РНК:

- QIAamp RNA Blood Mini Kit (50) (Cat No. 52304, Qiagen, Германия)
- TriZ reagent Kit (кат. номер IG-TRZK-60, Inogene, Россия)

При выделении образцов с использованием реагентов для стабилизации РНК, может быть рекомендовано использование наборов PAXgene Blood RNA Kit (Cat No. 762174, Qiagen, Германия) или TriZ reagent Kit (кат. номер IG-TRZK-60, Inogene, Россия)

Реагенты для проведения реакции обратной транскрипции:

Для проведения реакции обратной транскрипции мы рекомендуем использовать следующие наборы:

- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat No. K1621, ThermoFisher Scientific)
- SuperScript III (Cat No. 18080051, ThermoFisher Scientific)
- Reverse Transcription Kit (кат. номер IG-RT-1, Inogene, Россия)

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ: ООО «Иноген»



197376 Санкт-Петербург, наб. реки Карповки д.5
тел. (812) 921-70-15
www.inogene.ru
email: info@ino-gene.com