

по применению набора реагентов **CBFB-МУН11 А RQ Kit (inv(16), t(16;16)(p13;q22)), 48 тестов** для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *CBFB-МУН11* (вариант А) и мРНК гена *ABL1* в клиническом материале пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ, АМЛ) 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

Инверсия 16 хромосомы inv(16)(p13;q22) встречается примерно в 8-9% случаев первичного острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и образуется путем слияния гена *CBFB*, кодирующего часть СВФ транскрипционного фактора, и гена *МУН11*, кодирующего тяжелую цепь миозина гладкомышечных волокон. Обнаружено 10 вариантов транскриптов гена *CBFB-МУН11*. У более чем 85% inv(16)-позитивных пациентов определяется транскрипт А, типы D и E определяются примерно у 5% пациентов, остальные варианты встречаются в единичных случаях.

Пациенты ОМЛ, позитивные по инверсии 16 хромосомы, обычно имеют благоприятный прогноз – более 50% пациентов достигают полной ремиссии. Соответственно, транслокация *CBFB-МУН11* является важной мишенью при диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни.

По сравнению со стандартными методиками (кариотипирование, FISH), применение метода ПЦР в реальном времени (Real-Time Quantitative PCR, RQ-PCR) для оценки уровня экспрессии химерных транскриптов *CBFB-МУН11* позволяет добиться существенно более высокой чувствительности при оценке минимальной остаточной болезни (МОБ), выявляя одну опухолевую клетку среди 50000 здоровых.

Более подробная информация по диагностическим подходам, периодичности выполнения исследования и оценке прогноза заболевания содержатся на сайте международной организации European Leukemia Net (<http://www.leukemia-net.org>).

Набор предназначен для использования исключительно в исследовательских целях.

СОСТАВ НАБОРА

Комплект реагентов «**CBFB-МУН11 А RQ Kit, 48 тестов**» включает:

Реактив		Описание	Объем (мкл)	Кол-во	
ДНК-калибраторы	ABL1 / CBFB-МУН11 А	C1 ABL1 / CBFB-МУН11 А	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
		C2 ABL1 / CBFB-МУН11 А	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
		C3 ABL1 / CBFB-МУН11 А	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
		C4 ABL1 / CBFB-МУН11 А	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
		C5 ABL1 / CBFB-МУН11 А	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 пробирка
Олиго-нуклеотиды	CBFB-МУН11 А	PrimerMix CBFB-МУН11 А	Прозрачная окрашенная жидкость	150	1 пробирка
	ABL1	PrimerMix ABL1	Прозрачная окрашенная жидкость	150	1 пробирка
ПЦР Мастер-микс	PCR Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	750	2 пробирки	
MgCl ₂	MgCl ₂	Прозрачная бесцветная жидкость	75	1 пробирка	
Вода стерильная деионизированная	Water	Прозрачная бесцветная жидкость	1125	1 пробирка	

ДНК-калибраторы (C1, C2, C3, C4, C5) – представляют собой количественно охарактеризованные препараты плазмидной ДНК, содержащие вставки кДНК *CBFB-МУН11 А* и участков генов-нормализаторов *ABL1* и *GUSB*. Используются для построения калибровочной кривой ПЦР для *CBFB-МУН11 А* и *ABL1*, а также в качестве положительных контролей ПЦР.

Результат амплификации кДНК *CBFB-МУН11 А* регистрируется по каналу флуоресценции Green/FAM, результат амплификации *ABL1* регистрируется по каналу Yellow/JOE/HEX/R6G.

ВЫПОЛНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

При получении набора распределите реактивы на хранение в соответствие с температурным режимом:

- Олигонуклеотиды (PrimerMix), реакционную смесь (PCR Mix) и MgCl₂ необходимо хранить при температуре - 20°C.
- ДНК-калибраторы (C1...C5) необходимо хранить при температуре + 4°C (срок хранения - 4 месяца).

В случае длительного хранения всего набора рекомендована температура от -40 до -20°C. ДНК-калибраторы (C1...C5)

размораживаются однократно, после чего могут быть использованы в течение 2 месяцев.

- Перед началом работы разморозьте PrimerMix, PCR Mix и MgCl₂ при комнатной температуре (в течение 15-30 мин). Перед применением реактивов убедитесь, что кристаллы льда полностью растаяли;
- Тщательно перемешайте все компоненты реакции, осадите капли с помощью настольной центрифуги - 10 сек при 1000 g (quick spin);
- Внесите приготовленную ПЦР-смесь в микропробирку для ПЦР объемом 0,2 мл. Расход реагентов на реакцию:

Таблица 1. Расход реагентов на одну ПЦР-реакцию

Компонент набора	ПЦР-смесь, объем (мкл)		
	Из расчета на 1 реакцию	Из расчета на 26 реакций (10 проб пациентов)	Из расчета на 26 реакций (10 проб пациентов с учетом возможной погрешности дозатора)
PrimerMix CBFB-МУН11 А	1	26	28
PrimerMix ABL1	1	26	28
PCR Mix	10	260	280
MgCl ₂	0,5	13	14
H ₂ O	7,5 (до 20 мкл)	195	210

NB! Для каждого пациента рекомендуется выполнять исследование в двух повторах.

В каждую серию исследований рекомендуется ставить дополнительную контрольную пробирку без добавления ДНК-матрицы (NTC-контроль).

- Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавьте 5 мкл образца кДНК в пробирку с реакционной смесью;
- Необходимо поставить 5 контрольных образцов-калибраторов. Для этого в 5 микропробирок с ПЦР-смесью внесите по 5 мкл ДНК-калибратора (C1, C2, C3, C4, C5);
- Поместите микропробирки в амплификатор;
- Запрограммируйте прибор для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (**общий объем реакции составляет 25 мкл**):

Таблица 2. 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	95	10 мин	-	1
Cycling	95	15 с	-	50
	60	60 с	FAM/JOE/HEX	

Таблица 3. Программа амплификации для «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Повторов
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	10 с	-	47
	60	50 с	Green/Yellow	

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.

В одной пробирке регистрируется накопление продуктов амплификации участка кДНК *CBFB-МУН11 А* и участка кДНК гена-нормализатора *ABL1*.

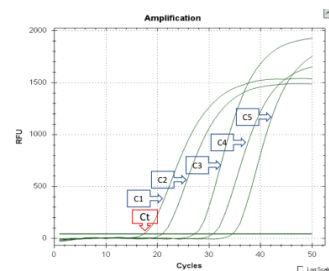


Рисунок 3. Накопление продукта амплификации

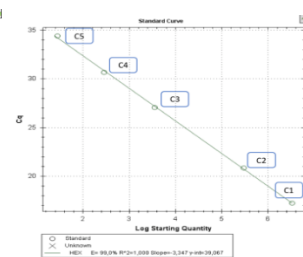


Рисунок 4. Пример калибровочной кривой ДНК-калибраторов

На основании значений порогового цикла «Ct» (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой

линией) и исходя из заданных значений калибраторов (**см. вкладыш к набору**) происходит автоматическое построение калибровочных кривых и расчет значений копийности *CBFB-MYH11 A* и *ABL1* в образце (см. руководство к соответствующему термоциклеру для ПЦР в реальном времени).

Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации копий *CBFB-MYH11 A* в исследуемых и контрольных образцах по следующей схеме:

1. Рассчитать отношение для всех образцов:
Число копий кДНК *CBFB-MYH11 A* / число копий кДНК *ABL1*
2. Рассчитать среднее значение отношения концентрации *CBFB-MYH11 A/ABL1* для двух повторов образца, умножить полученный результат на 100.

КРИТЕРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Критерий	Допустимые значения/результаты
Отклонение Ct между повторами	≤ 2 (при среднем значении Ct >36) ≤ 1,5 (при среднем значении Ct ≤36)
Угловой коэффициент стандартной кривой (Slope)	между -3,0 и -3,9 (при эффективности ПЦР 100% Slope= -3,32)
Коэффициент детерминации (R ²) для стандартной кривой	> 0.98
Минимальное стандартное разведение C5 или C4 (для гена <i>ABL1</i>)	Должно детектироваться и включаться в стандартную кривую
Контроль качества пробы пациента по количеству копий <i>ABL1</i> на реакцию (<i>ABL1</i> кк)	<i>ABL1</i> кк > 10 000 для достижения оптимальной чувствительности
Отрицательные контроли без добавления матрицы (NTC) для <i>CBFB-MYH11 A</i> и <i>ABL1</i>	Не должны детектироваться

ВАЖНО! Результаты не подлежат учету если:

1. Значение концентрации *ABL1* (гена-нормализатора) менее 10000 копий / реакция: образец рассматривается как невалидный, требуется перестановка данного образца, начиная с первого этапа анализа. В случае воспроизведения результата требуется перезабор материала.
2. Отличие отношений концентрации *CBFB-MYH11 A/ABL1* для двух повторов одного образца более чем четырехкратное. Т.е. (повтор-1 *CBFB-MYH11 A/ABL1*) / (повтор-2 *CBFB-MYH11 A/ABL1*) > 4 или < 0,25*
*За исключением образцов, для которых измеренное число копий *CBFB-MYH11 A* менее 25.
3. Коэффициент детерминации R² при построении калибровочной кривой менее 0,95: требуется перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа.
4. 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.

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Дополнительную информацию можно получить в следующих источниках:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Marcucci G, Caligiuri MA, Dohner H, Archer KJ, Schlenk RF, Dohner K et al. Quantification of *CBFBeta/MYH11* fusion transcript by real time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 1072-1080
5. Buonamici S, Ottaviani E, Testoni N, Montefusco V, Visani G, Bonifazi F et al. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 2002; 99: 443-449.

Принцип метода:

Метод определения уровня экспрессии гена *CBFB-MYH11 A* в клиническом материале основан на амплификации с детекцией в режиме «реального времени» с помощью технологии TaqMan, в основе которой лежит гидролиз зондов за счет 5'-3' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы). Согласно данной технологии матрицу добавляют в смесь ПЦР, содержащую стандартные компоненты и зонд,

способный гидрироваться с матрицей между двумя примерами. Зонд мечен флуорофором (FAM или HEX) 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. ПЦР осуществляется в ПЦР-миксе с двумя видами олигонуклеотидов: амплификация участка мРНК *CBFB-MYH11 A* и фрагмента мРНК области сплайсинга гена *ABL1* (рекомендован рабочей группой «Europe Against Cancer», EAC), в качестве эндогенного внутреннего контроля и гена-нормализатора.

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 °С). 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 °С 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 задевая 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 °С или 4 суток при температуре 4 °С.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Оборудование:

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

