

NPM1 Muta Prime FA Kit – набор реагентов для выявления инсерционных мутаций в гене NPM1. Соответствующие праймеры для ПЦР метят флуоресцентным красителем 6-FAM, обнаружение мутаций основано на разделении продуктов ПЦР с помощью капиллярного гель-электрофореза с последующим фрагментным анализом ампликонов.

Совместимы с генетическими анализаторами Life Technologies (3130, 3500, 3500xl)

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Ген нуклеофозмина (NPM1) кодирует белок, который физиологически перемещается между ядром и цитоплазмой, действуя как молекулярный шаперон для установления множественных межбелковых взаимодействий. Белок NPM1 обычно участвует в критических клеточных функциях, таких как контроль образования и экспорта рибосом, стабилизация онкосупрессорного белка p14 Arf в ядрышке и регуляция дупликации центросом. Мутации гена NPM1, встречающиеся примерно в 30% случаев AML у взрослых и в 50–60% случаев AML с нормальным кариотипом, представляют собой одно из наиболее частых молекулярных повреждений, наблюдаемых при AML. Описано более 55 различных мутаций, в основном встречающихся в 12 экзоне, но три типа мутаций (A, B и D) составляют 95% всех случаев. Мутации гена NPM1 приводят к структурным изменениям C-конца белка NPM1 с последующей aberrантной цитоплазматической локализацией. Это цитоплазматическое накопление мутированного белка NPM1 вызывает нарушения множественных клеточных путей за счет комбинации потери функций и приобретения функций, критических для лейкемогенеза.

Капиллярный гель-электрофорез - метод разделения продуктов ПЦР в электрическом поле внутри капилляра заполненного полимером. При подаче высокого напряжения флуоресцентно маркированные продукты ПЦР и другие компоненты начинают проходить внутри капилляра со скоростью, зависящей от их электрического заряда и массы, и поэтому попадают в зону обнаружения в разное время. Обнаруженные продукты ПЦР отображаются в виде последовательности флуоресцентных пиков. Таким образом, время миграции является ключевой характеристикой качества молекулы, тогда как высота и площадь пиков являются количественными параметрами образца.

Для диагностики мутации NPM1, необходимо взять образцы геномной ДНК, выделенной из периферической крови или костного мозга.

Идентификация мутаций NPM1 состоит из трех этапов:

1. Выделение ДНК из клинических образцов
2. ПЦР-амплификация целевого локуса ДНК
3. Этап обнаружения: капиллярный гель-электрофорез с последующим фрагментным анализом.

Выделение ДНК из образцов клинического материала пациента

Экстракцию ДНК можно проводить с помощью набора для экстракции ДНК любого производителя. Тем не менее, мы рекомендуем проводить выделение ДНК с помощью магнитных наночастиц или сорбентным методом с колонками, например Column DNA Kit (Inogene, Cat. No IG-CDK-100).

Извлеченную ДНК необходимо хранить при -20°C. Оптимальный диапазон концентрации ДНК составляет от 200 до 400 нг на одну ПЦР.

Набор предназначен для использования исключительно в исследовательских целях.

СОСТАВ НАБОРА

Комплект реагентов NPM1 Muta Prime FA Kit включает:

Компонент	Название реагента	Объем (мкл)	Кол-во
Вода, свободная от нуклеаз	Nuclease Free Water	400	1 пробирка
Реакционная смесь	PCR mix	312,5	1 пробирка
Смесь праймеров	Primer Mix	16	1 пробирка
Позитивные контроли: Контроль ДНК-Wilde type NPM1 Контроль ДНК- Mutation control NPM1	NPM1 MUT/ WT	50	1 пробирка

Результат амплификации ДНК FLT3 ITD регистрируется по каналу флуоресценции Green/FAM, результат амплификации FLT3 TKD (D835) регистрируется по каналу Yellow/JOE/HEX/R6G генетического анализатора.

ВЫПОЛНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Перед началом работы разморозьте компоненты набора 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. 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)
PCR mix	12,5
Primer Mix	0,6
Nuclease Free Water	7 (до 25 мкл)

4. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавьте 5 мкл образца ДНК пациента (200-400 нг) в пробирку с реакционной смесью. В каждой серии исследований используется контрольная ДНК (NPM1 MUT/WT) и контроль без добавления ДНК-матрицы (NTC-контроль) – 5 мкл на реакцию. При высокой концентрации ДНК пациента желательно заместить объем ДНК, вносимой в реакцию, водой из набора. Конечный объем реакции ПЦР – 25 мкл. Тщательно перемешайте содержимое пробирки.
5. Поместите микропробирки в амплификатор;
6. Запрограммируйте прибор для выполнения следующей программы амплификации

Программа амплификации для твердотельных термоциклеров планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Hold	95	10 мин	-
Cycling	95	10 с	40
	60	20 с	
	72	30 с	
Store	10	∞	-

Капиллярный гель-электрофорез

Последний этап выявления мутаций NPM1 (фрагментарный анализ) выполняется методом капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе, например Life Technologies (3130, 3500, 3500xl) с полимером POP7 или POP4.

Для фрагментного анализа при обнаружении мутаций FLT3 могут быть использованы программы GeneMapper, Peak Scanner, GeneMarker.

Подготовка проб к фрагментному анализу

В 1,5 мл пробирке замешать:

		x1	x16
Hi-DiTM Formamide	User-supplied Thermo Fisher Scientific (4311320)	10 µl	170 µl
LIZ600 dye size standard	User-supplied Thermo Fisher Scientific (4366589)	0.4 µl	6.8 µl

1. Перемешайте и быстро центрифугируйте пробирку объемом 1,5 мл, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

2. Добавьте по 10 мкл приготовленной смеси в каждую лунку 96-луночного планшета.

3. В эти же лунки внести по 1 мкл ПЦР продукта.

4. Закройте планшет резиновым уплотнителем (септой), центрифугировать 30 секунд с частотой вращения 1000 rpm.

5. Установить в каретку секвенатора.

ПРИМЕЧАНИЕ. Образцы, разбавленные формамидом Hi-DiTM, можно хранить не более 24 часов.

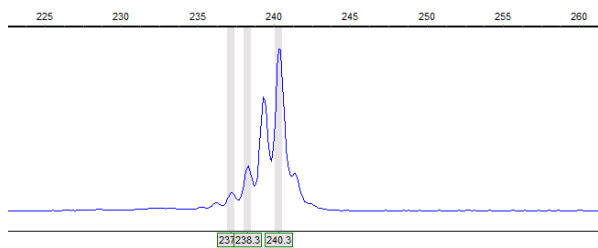
Формамид Hi-DiTM и продукты ПЦР следует хранить при -20°C, LIZ600 - при + 4°C.

АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

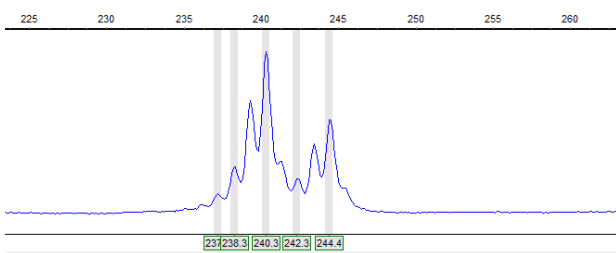
После обработки сигнала компьютером, результат фрагментного анализа виден как набор пиков в области амплификации целевого участка.

Оценка результатов исследования на мутацию NPM1 проводится по каналу FAM.

При анализе мутации в гене NPM1 пик, соответствующий ампликону длиной 240 bp расценивается как продукт дикого типа гена (без мутации). В то же время иные продукты с длиной ампликона 244 bp расцениваются как мутантные.



Дикий тип NPM1 - пик 240 bp.



MUT NPM1 - Наличие второго пика

Уровень аллельной нагрузки мутации в гене NPM1 рассчитывается по формуле: $\text{mut NPM1} / (\text{mut NPM1} + \text{wt NPM1}) \times 100\%$, где mut NPM1 и wt NPM1 - площади под соответствующими пиками на электрофореграмме.

СПРАВочная информация

Дополнительную информацию можно получить в следующих источниках:

1. Heath E.M., Chan S.M., Minden M.D., Murphy T., Shlush L.I., Schimmer A.D. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31:798–807. doi: 10.1038/leu.2017.30.
2. Falini B., Nicoletti I., Martelli M.F., Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): Biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109:874–885. doi: 10.1182/blood-2006-07-012252.
3. Falini B., Bolli N., Liso A., Martelli M.P., Mannucci R., Pileri S., Nicoletti I. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: Molecular basis and clinical implications. *Leukemia*. 2009;23:1731–1743. doi: 10.1038/leu.2009.124.
4. Grimwade D., Ivey A., Huntly B.J.P. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127:29–41. doi: 10.1182/blood-2015-07-604496.

Отбор и хранение образцов

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

дополнительные реагенты

Варианты наборов реагентов для выделения ДНК:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) (Cat No. 51104, Qiagen, Германия)
- Column DNA Kit (кат. номер IG-CDK-100, Inogene, Россия)

Реагенты, необходимые для проведения капиллярного гелеэлектрофореза:

- Hi-DiTM Formamide (Cat No. 4311320, Thermo Fisher Scientific)
- LIZ600 dye size standard (Cat No. 4366589, Thermo Fisher Scientific)

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:



ООО «Иноген»

197376 Санкт-Петербург, наб. реки Карповки д.5

тел. (812) 921-70-15

www.inogene.ru

email: info@inogene.ru