

по применению набора реагентов **BCR-ABL1 MbcR RQ Kit (b2a2, b3a2 transcripts, p210), 48 tests** для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *BCR-ABL1* (вариант Mbcr) и мРНК гена *ABL1* в клиническом материале пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) и острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) 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

Химерный ген *BCR-ABL* образуется в результате слияния длинных плеч 9 и 22 хромосом, что приводит к образованию так называемой Филадельфийской хромосомы (t(9;22), Ph+). Данная транслокация характерна для хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) и острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), а также встречается при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). Химерный ген *BCR-ABL* кодирует белок, обладающий тирозинкиназной активностью и играет важную роль в развитии лейкоза. Существует несколько вариантов транскриптов гена *BCR-ABL*, характерных для разных типов лейкоза. Так, для ХМЛ преимущественно характерны транскрипты b3a2 и b2a2, приводящие к образованию белка с молекулярной массой 210 кДа (p210 transcripts, Mbcr), в то время как у большинства детей с Ph+ ОЛЛ обнаруживается химерный транскрипт e1a2, кодирующий белок с молекулярной массой 190 кДа (p190 transcripts, mbcr). Оба транскрипта *BCR-ABL mbcr* и *BCR-ABL Mbcr* также встречаются в ряде случаев у взрослых пациентов с ОЛЛ.

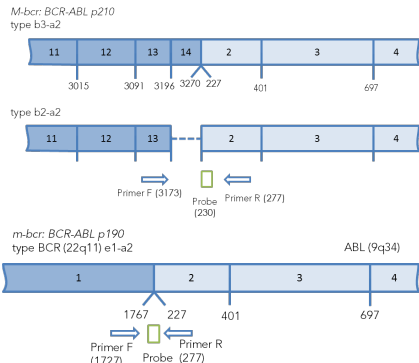


Рисунок 1. Схема образования химерных транскриптов *BCR-ABL1 b3a2, b2a2 и e1a2*. Обозначены места связывания праймеров и зондов для ПЦР в режиме «реального времени». Положения праймеров и зондов указаны относительно 5'-конца нуклеотидных последовательностей нормальных транскриптов.

Применение метода ПЦР в реальном времени (Real-Time Quantitative PCR, RQ-PCR) для оценки уровня экспрессии химерного транскрипта *BCR-ABL1* позволяет добиться 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 содержится на сайте международной организации European Leukemia Net (<http://www.leukemia-net.org>).

Набор реагентов рассчитан на проведение исследования в количественном формате для 48 клинических образцов в двух повторах (144 ПЦР-реакции, включая контрольные).

Набор предназначен для использования исключительно в исследовательских целях.

СОСТАВ НАБОРА

Комплект реагентов «BCR-ABL1 MbcR RQ Kit, 48 tests» включает:

Реактив		Описание	Объем (мкл)	Кол-во	
ДНК-калибраторы	ABL1/BCR-ABL1 Mbcr	C1 ABL1 / BCR-ABL1 Mbcr	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 пробирка
		C2 ABL1 / BCR-ABL1 Mbcr	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 пробирка
		C3 ABL1 / BCR-ABL1 Mbcr	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 пробирка
		C4 ABL1 / BCR-ABL1 Mbcr	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 пробирка
		C5 ABL1 / BCR-ABL1 Mbcr	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 пробирка
Олиго-нуклеотиды	BCR-ABL1 Mbcr	PrimerMix BCR-ABL1 Mbcr	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
Вода стерильная деионизированная		H ₂ O	Прозрачная бесцветная жидкость	450	1 пробирка

ДНК-калибраторы (C1, C2, C3, C4, C5) - представляют собой количественно охарактеризованные препараты плазмидной ДНК, содержащих вставки кДНК *BCR-ABL1 Mbcr* и

участка гена-нормализаторов *ABL1* и *GUSB*. Используются для построения калибровочной кривой ПЦР для *BCR-ABL1 Mbcr* и *ABL1*, а также в качестве положительных контролей ПЦР.

Результат амплификации кДНК *BCR-ABL1 Mbcr* 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 соответствии с температурным режимом:

- Реакционную смесь (PCRMix) необходимо хранить при температуре + 4°C.
- Олигонуклеотиды (PrimerMix) необходимо хранить при температуре - 20°C.
- ДНК-калибраторы (C1-C5) необходимо хранить при температуре + 4°C (срок хранения - 4 месяца).

1. Перед началом работы разморозьте PrimerMix при комнатной температуре (в течение 15-30 мин). Перед применением смеси 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 (куполообразная крышка). 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 12 реакций (6 проб пациентов)	Из расчета на 22 реакции (10 проб пациентов)
PrimerMix BCR-ABL1 Mbcr	1		
PrimerMix ABL1	1		
PCR Mix	10		
H ₂ O	до 15 мкл		

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).

4. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавьте 5 мкл образца кДНК в пробирку с реакционной смесью;
5. 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);
6. Поместите микропробирки в амплификатор;
7. Запрограммируйте прибор для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала:

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	50	2 мин	-	1
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	50	2 мин	-	1
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 участков кДНК *BCR-ABL1 Mbcr* и кДНК гена-нормализатора *ABL1*

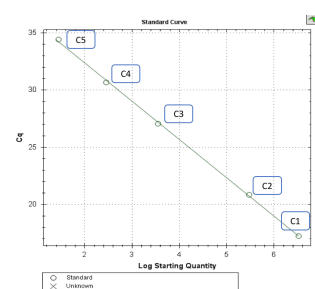
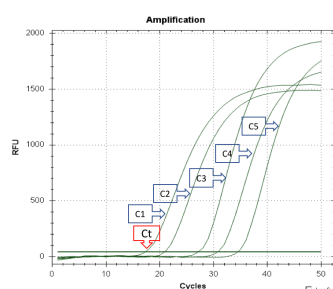


Рисунок 3. Накопление продукта амплификации кривой ДНК-калибраторов в пробирках с ПЦР-смесью

Рисунок 4. Пример калибровочной кривой ДНК-калибраторов на приборе «CFX96» (Bio-Rad)

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 копиности *BCR-ABL1 Mbc* и *ABL1* в образце ПЦР (см. руководство к соответствующему термоциклеру для ПЦР в реальном времени).

Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации копий *BCR-ABL1 Mbc* в исследуемых и контрольных образцах по следующей схеме:

1. Рассчитать отношение для всех образцов

Число копий кДНК *BCR-ABL1 Mbc* / число копий кДНК *ABL1*

2. Рассчитать среднее значение отношения концентраций *BCR-ABL1 Mbc*

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>BCR-ABL1 Mbc</i> и <i>ABL1</i>	Не должны детектироваться

ВАЖНО! Результаты не подлежат учету если:

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

- 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.
- Vaccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 27, 6041.
- Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 20, 1925.
- Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 108, 28.
- 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.
- Gabert, J. et al. (2003) 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* 17, 2318.
- 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 определения уровня экспрессии гена *BCR-ABL1 Mbc* 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 гибридизоваться с матрицей между двумя праймерами. 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 *BCR-ABL1 Mbc* 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°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-gen.com