

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов **JAK2 MutaPrime RQ Kit (V617F), 24 tests** для выявления и количественного определения аллельной нагрузки мутантной формы **JAK2** в клиническом материале пациентов с Ph-негативными хроническими миелопролиферативными опухолями (МПО, ХМПЗ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Для приборов

- «iQ5» («Bio-Rad», США);
- «ABIPrism» 7x00 («Applied Biosystem», США)
- «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

Назначение теста

Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) – это группа заболеваний, при которых наблюдается избыточная продукция в костном мозге клеток миелоидной линии дифференцировки. В последние годы был достигнут значительный прогресс в понимании молекулярного патогенеза ХМПЗ. Наряду с описанной в 1960 году филадельфийской хромосомой (Ph), которая является одним из основных диагностических критериев хронического миелоидного лейкоза, были обнаружены специфические генетические аномалии, характерные для Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваний, таких как: истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз. Среди них наиболее важными являются мутации гена JAK2 в 14 экзоне (JAK2 V617F), мутации 12 экзона JAK2, мутации в генах кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL).

Большая часть пациентов с классическими Ph-негативными ХМПЗ несут мутацию JAK2V617F, ведущей к конститутивной активации тирозинкиназы JAK2. На генетическом уровне мутация выражается в замене нуклеотида гуанина (G) на тимин (T) в положении 1849, входящего в состав экзона 14 гена JAK2. Эта мутация приводит к замене аминокислоты валина на фенилаланин в кодоне 617 белка тирозинкиназы JAK2. Мутация V617F присутствует в клетках периферической крови и красного костного мозга также у небольшой части пациентов с другими клональными гематологическими расстройствами, такими как: миелодиспластический синдром, атипичные ХМПЗ и острая миелоидная лейкемия. Частота мутации JAK2V617F при различных Ph-негативных МПЗ оценивается как: 95% при истинной полицитемии, 50% при эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе, 20% при неклассических ХМПЗ и 1-10% при *de novo* возникших острой миелоидной лейкемии или миелодиспластическом синдроме (Tefferi, 2008). Данная мутация не наблюдается при немиелоидных новообразованиях или реактивной миелопролиферации.

Согласно диагностическим критериям ВОЗ (2016 г.) мутация JAK2 V617F включена в список стандартных молекулярных маркеров для диагностики ХМПЗ. Результатом этих открытий стал пересмотр диагностических критериев ВОЗ для «классических» ХМПЗ в 2008 году и инициация исследований по разработке новых методов таргетной терапии этих заболеваний.



ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект реагентов «**JAK2 MutaPrime RQ Kit (V617F), 24 tests**» включает:

Реактив		Описание	Объем (мкл)	Кол-во	
ДНК-калибраторы	JAK2 V617F	C1 JAK2 MUT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C2 JAK2 MUT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C3 JAK2 MUT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C4 JAK2 MUT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C5 JAK2 MUT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
	JAK2 WT	C1 JAK2 WT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C2 JAK2 WT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C3 JAK2 WT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C4 JAK2 WT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C5 JAK2 WT	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
Синтетические олигонуклеотиды	JAK2 V617F	PrimerMix MUT	Прозрачная бесцветная жидкость	140	1 пробирка
	JAK2 WT	PrimerMix WT	Прозрачная бесцветная жидкость	140	1 пробирка
ПЦР Мастер-микс		PCR Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	900	2 пробирки
Вода качества mQ		H ₂ O	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	1 пробирка

ДНК-калибраторы (C1, C2, C3, C4, C5) – представляют собой количественно охарактеризованные препараты плазмид, содержащих вставку ДНК мутантной формы JAK2 V617F (MUT) или ДНК формы JAK2 дикого типа (WT). Используются для построения калибровочной кривой ПЦР для обеих ПЦР-смесей *JAK2 MUT* и *JAK2 WT*, а также в качестве положительных контролей ПЦР.



НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для выявления и количественного определения аллельной нагрузки мутантной формы **ЈАК2** в клиническом материале пациентов с Rh-негативными хроническими миелопролиферативными заболеваниями методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Набор реагентов может быть использован для подтверждения диагноза ХМПЗ и для мониторинга эффективности терапии - оценки МОБ.

Набор реагентов рассчитан на проведение исследования в количественном формате для 24 клинических образцов в двух повторах (132 ПЦР-реакции, включая контрольные).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения аллельной нагрузки мутантной формы гена **ЈАК2** 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 аллель-специфичный зонд, способный гибридизоваться с матрицей между двумя праймерами. Зонд мечен флуорофором (FAM для *ЈАК2 MUT*; HEX для *ЈАК2 WT*) 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 отдельных ПЦР-миксах с двумя смесями олигонуклеотидов: амплификация участка *ЈАК2 MUT* и *ЈАК2 WT*.

Результат амплификации ДНК *ЈАК2 MUT* регистрируется по каналу флуоресценции FAM, результат амплификации *ЈАК2 WT* регистрируется по каналу Yellow/JOE/HEX/R6G. Использование *ЈАК2 WT* в качестве эндогенного внутреннего контроля позволяет контролировать основные этапы анализа (забор, транспортирование, хранение, выделение ДНК), а также точно рассчитывать количество ДНК гена *ЈАК2 MUT*.



МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Все работы выполняются только в одноразовых перчатках, которые используют и меняют при каждой операции (выделение ДНК и постановка ПЦР). При возникновении вопросов по возможному причинению вреда здоровью и мерам их предотвращения необходимо ознакомиться с прилагаемым к тест-системе паспортом безопасности (MSDS).
2. Используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.
3. Одноразовые пластиковые наконечники для автоматических пипеток необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
4. Анализ проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах).
5. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.
6. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после начала работ облучаться ультрафиолетовым светом.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

Варианты наборов реагентов для выделения ДНК:

- «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, кат. номер **103-20**)
- «К-сорб» (Синтол, кат. номер EX-514)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, кат. номер 51104, 51106)

Оборудование и расходные материалы

ЗОНА 1. Этап выделения ДНК

1. Стерильный ламинарный шкаф;
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 °С до 100 °С;
3. Настольная центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс. об/мин;



4. Вортекс;
5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл;
7. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл и наконечников;
8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл;
9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл;
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
11. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки;
12. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2. Этап проведения амплификации, а также детекции продуктов амплификации требуются:

1. Амплификатор «iQ iCycler» (Bio-Rad), «Quantstudio» (Applied Biosystem) или «Rotor-Gene» 3000/6000;
2. Для прибора iQ iCycler или Quantstudio: одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (куполообразная крышка) , 96-луночный планшет для ПЦР, снабженный термостабильными оптически прозрачными пленками;
3. Для прибора «Rotor-Gene»: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) для постановки в ротор на 36 пробирок или 0,1 мл для постановки в ротор на 72 пробирки;
4. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
5. Одноразовые наконечники для микропипеток до 200 мкл;
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл;
8. Штативы для наконечников и микропробирок объемом 0,2 мл;
9. Холодильник от 2 до 8 °С, с морозильной камерой не выше минус 16 °С для реагентов и выделенных ДНК;
10. Отдельный халат и одноразовые перчатки;
11. Емкость для сброса наконечников;



ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ, ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

1. Образец с ЭДТА. Материал помещают в пробирку типа Vacutainer (BD) с 6% раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку несколько раз переворачивают.
2. Выделить ДНК согласно инструкции производителя набора для выделения. Оптимальная концентрация ДНК на реакцию составляет 50-100нг

ВЫПОЛНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разморозьте все реактивы и поместите их на лед
2. Перемешайте на вортексе все компоненты реакции.
3. Смешайте ПЦР-смеси для *JAK2 MUT* и *JAK2 WT* в отдельных микропробирках для ПЦР объемом 0,2 мл (куполообразная крышка). Расход реагентов на одну реакцию:

Реактив	ПЦР-смесь <i>JAK2 MUT</i> (Объем, мкл)	ПЦР-смесь <i>JAK2 WT</i> (Объем, мкл)
PrimerMix <i>JAK2 MUT</i>	1,9	-
PrimerMix <i>JAK2 WT</i>	-	1,9
PCR Mix	12,5	12,5
H ₂ O	до 17 мкл	до 17 мкл

Следует перемешивать на вортексе все компоненты реакции перед добавлением в реакционную смесь;

В каждую постановку рекомендуется ставить дополнительную контрольную пробирку без добавления ДНК-матрицы (NTC-контроль) для каждого из наборов праймеров (PrimerMix *JAK2 MUT* и PrimerMix *JAK2 WT*)

4. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавьте по 3 мкл образца ДНК в пробирку с реакционной смесью *JAK2 MUT*, затем в пробирку с реакционной смесью *JAK2 WT*;



5. Необходимо поставить по 5 контрольных образцов-калибраторов для смеси *JAK2 MUT* и *JAK2 WT*. Для этого в 5 микропробирок для *JAK2 MUT* и 5 микропробирок для *JAK2 WT* внесите по 3 мкл соответствующего ДНК-калибратора (C1, C2, C3, C4, C5);
6. Поместите микропробирки в амплификатор;
 На рисунках 1 и 2 представлены примеры схем расположения пробирок в амплификаторах из расчета на 8 тестов (8 проб пациентов)

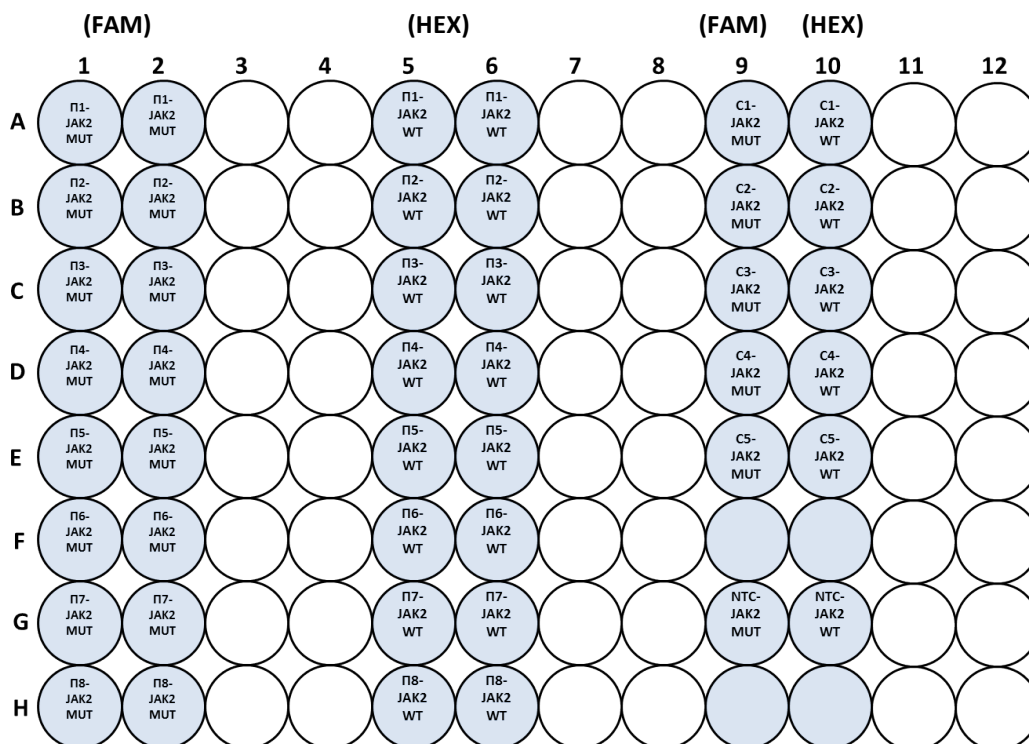


Рисунок 1. Пример схемы расположения пробирок в амплификаторе на 8 тестов амплификации для термоциклеров «iQ iCycler» (Bio-Rad) и «Quantstudio» (Applied Biosystem) П – кДНК пациента, С – ДНК-калибратор, NTC – контроль без матрицы

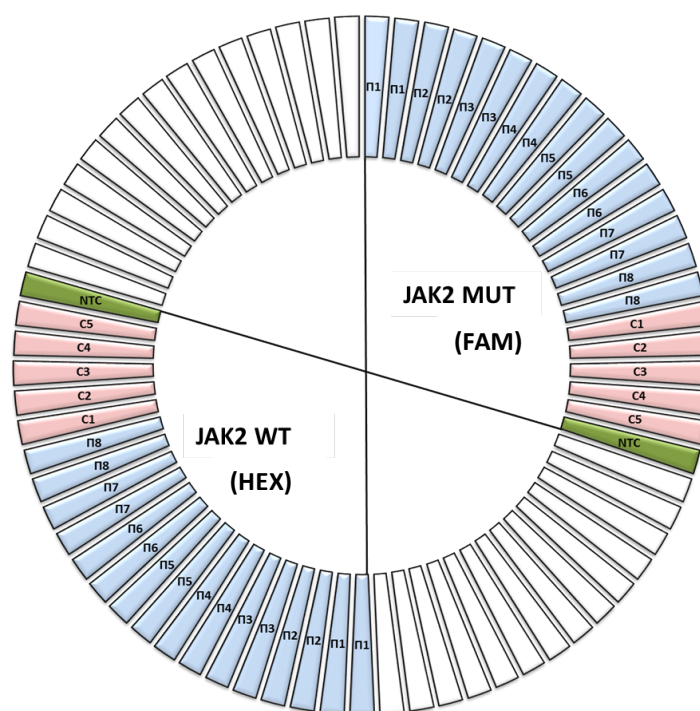


Рисунок 2. Пример схемы расположения пробирок в амплификаторе «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия) на 8 тестов.

П – кДНК пациента, С – ДНК-калибратор, NTC – контроль без кДНК-матрицы

- Запрограммируйте прибор для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала: - поменять протокол

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

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Повторов
Hold	50	2 мин		1
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	10 с	-	40
	55	30 с	-	
	60	30с	FAM/JOE	

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

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Повторов
Hold	50	2 мин		1
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	10 с	-	40
	55	30 с	-	
	60	30с	FAM/JOE	

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 пробирках с ПЦР- смесью *JAK2 MUT* регистрируют накопление продукта амплификации участка ДНК *JAK2 MUT*, в пробирках с ПЦР-смесью *JAK2 WT –JAK2 WT* (Рис.3).

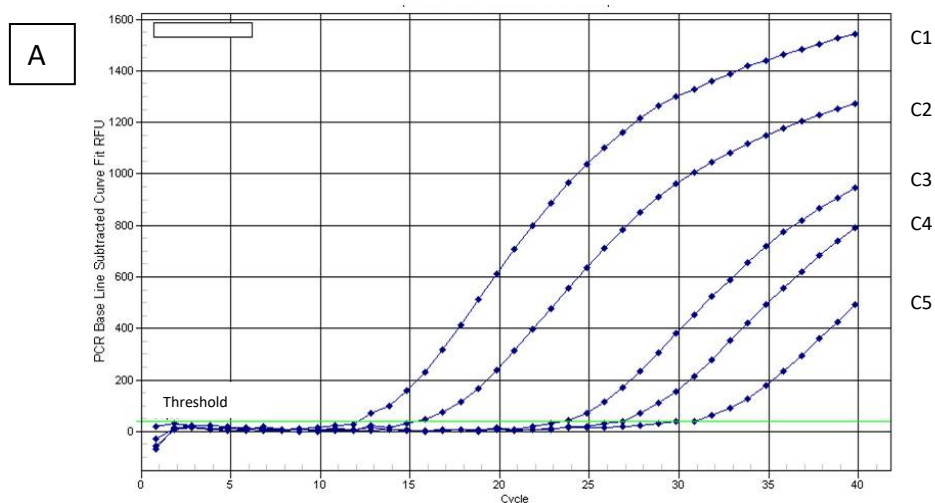


Рисунок 3. Накопление продукта амплификации ДНК-калибраторов в пробирках с ПЦР-смесью *JAK2 MUT* (А) и *JAK2 WT* (Б)



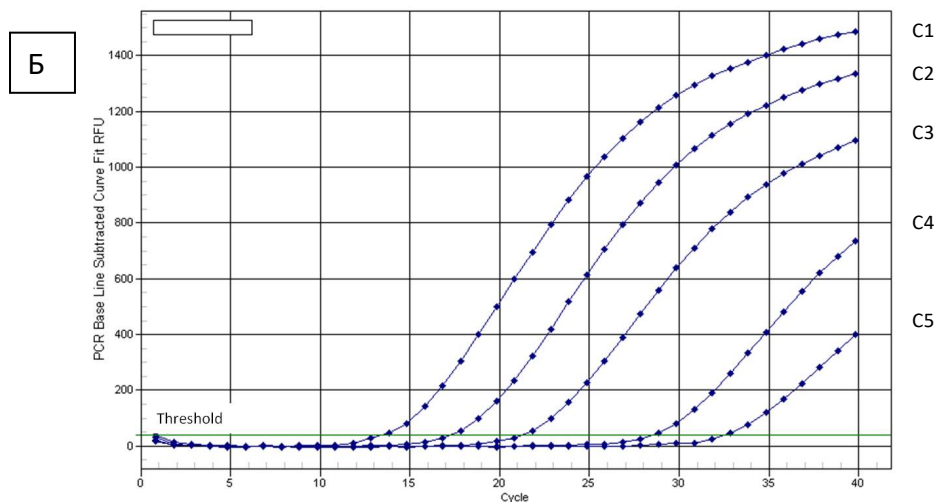


Рисунок 3. Накопление продукта амплификации ДНК-калибраторов в пробирках с ПЦР-смесью JAK2 MUT (А) и JAK2 WT (Б)

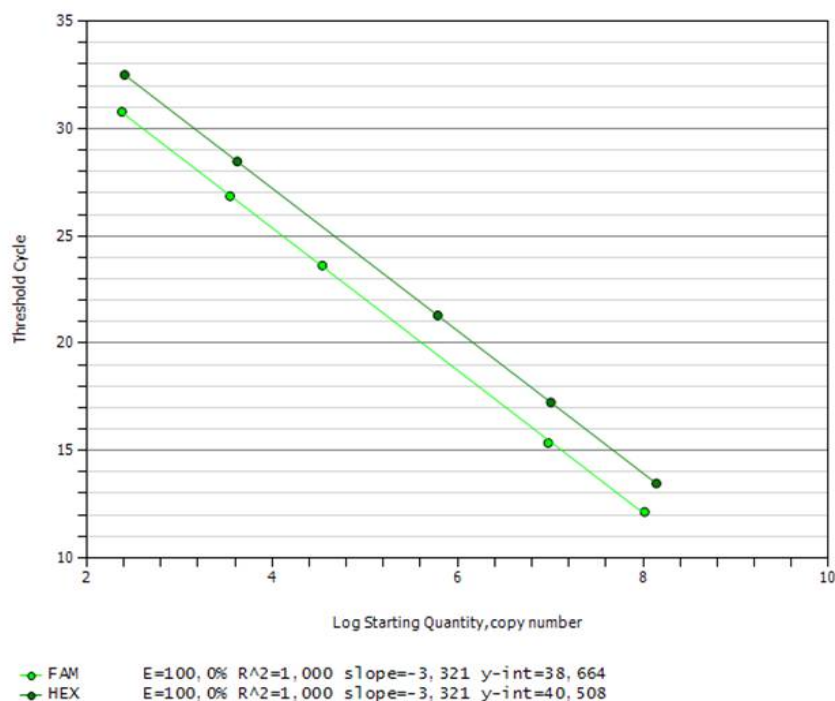


Рисунок 4. Пример калибровочной кривой на приборе «iQ5 iCycler» (Bio-Rad)

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) сначала для смеси JAK2 MUT, затем для смеси JAK2 WT происходит автоматическое построение калибровочной кривой и расчет значений копийности JAK2 MUT и JAK2 WT в образце ПЦР (см. руководство к соответствующему термоциклеру для ПЦР в реальном времени) (Рис.4).



Полученные значения используют для расчета аллельной нагрузки мутантной формы гена *JAK2* в исследуемых и контрольных образцах по следующей формуле:

$$JAK2 V617F (\%) = \frac{CN mutant}{CN mutant + CN WT} * 100, \text{ где}$$

CN mutant – количество копий *JAK2 MUT* в образце ДНК, рассчитанное на основании калибровочной кривой

CN WT - количество копий *JAK2 WT* в образце ДНК, рассчитанное на основании калибровочной кривой

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 -3,07 и -3,81 (при эффективности ПЦР 100% Slope= -3,32)
Коэффициент корреляции (R ²) для стандартной кривой	≥ 0.98
Минимальное стандартное разведение C5	Должно детектироваться и включаться в стандартную кривую
Суммарное количество копий (CN mutant + CN WT)	должно составлять больше 10000
Отрицательные контроли без добавления матрицы (NTC)	Не должны детектироваться

В случае выхода результатов за рамки допустимых значений, указанных в таблице критериев контроля качества, результаты по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб.



Дополнительную информацию можно узнать в следующих статьях:

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. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054–1061.
5. Daniel A. Arber, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, James W. Vardiman The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia *Blood* 2016 127:2391-2405

