



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов **RQ Kit RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO t(8;21)(q22;q22))** для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *RUNX1-RUNX1T1* и мРНК гена *ABL* в клиническом материале пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ, AML) 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

Хромосомная реаранжировка  $t(8;21)(q22;q22)$ , в результате которой образуется химерный транскрипт - продукт слияния 5 экзона гена *RUNX1* (*CBFA2*, *AML1*) на хромосоме 21q22 и 2 интрона гена *RUNX1T1* (*ETO*) на хромосоме 8q22, встречается примерно в 8% случаев ОМЛ среди детей и взрослых пациентов до 20 лет.

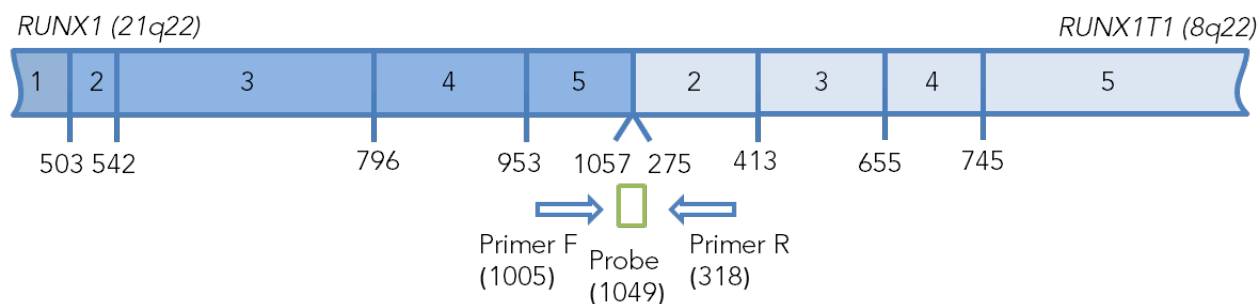


Рисунок 1. Схема образования химерного транскрипта *RUNX1-RUNX1T1*. Обозначены места связывания праймеров и зондов для ПЦР-РВ. Положения праймеров и зондов указаны относительно 5'-конца нуклеотидных последовательностей нормальных транскриптов.

Обнаружение химерного транскрипта *RUNX1-RUNX1T1* считается маркером благоприятного прогноза для пациентов с ОМЛ и является важной мишенью для мониторинга минимальной остаточной болезни.

По сравнению со стандартными методиками (кариотипирование, FISH, ИФА), применение метода ПЦР в реальном времени (Real-Time quantitative PCR, RQ-PCR) для оценки уровня экспрессии химерного транскрипта *RUNX1-RUNX1T1* 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 содержится на сайте международной организации European Leukemia Net (<http://www.leukemia-net.org>).

## ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект реагентов «**RUNX1-RUNX1T1 RQ Kit, 24 tests**» включает:

Реактив		Описание	Объем (мкл)	Кол-во	
ДНК-калибраторы	ABL1 RUNX1- RUNX1T1	C1 ABL1 / RUNX1- RUNX1T1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C2 ABL1 / RUNX1- RUNX1T1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C3 ABL1 / RUNX1- RUNX1T1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C4 ABL1 / RUNX1- RUNX1T1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C5 ABL1 / RUNX1- RUNX1T1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
Олиго- нуклеотиды	RUNX1- RUNX1T1	PrimerMix RUNX1- RUNX1T1	Прозрачная окрашенная жидкость	70	1 пробирка
	ABL1	PrimerMix ABL1	Прозрачная окрашенная жидкость	70	1 пробирка
ПЦР Мастер-микс		PCR Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	700	2 пробирки
Вода стерильная деионизированная		H <sub>2</sub> O / Water	Прозрачная бесцветная жидкость	1400	1 пробирка

ДНК-калибраторы (C1, C2, C3, C4, C5) – представляют собой количественно охарактеризованные препараты плазмид, содержащих вставки участков кДНК *RUNX1-RUNX1T1* и гена-нормализатора *ABL1*. Используются для построения калибровочной кривой ПЦР для обеих ПЦР-смесей *RUNX1-RUNX1T1* и *ABL1*, а также в качестве положительных контролей ПЦР.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для количественного определения уровня экспрессии гена *RUNX1-RUNX1T1* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов может быть использован оценки вероятности развития рецидива у пациентов с острыми лейкозами.

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

Набор предназначен для использования исключительно в исследовательских целях.



## ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения уровня экспрессии гена *RUNX1-RUNX1T1* 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 - 6'-карбоксифлуоресцеин) 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 мРНК *RUNX1-RUNX1T1* и фрагмента мРНК области сплайсинга гена *ABL1* (рекомендован рабочей группой «Еurope Against Cancer», EAC), в качестве эндогенного внутреннего контроля и гена-нормализатора.

Результаты амплификации кДНК *RUNX1-RUNX1T1* и *ABL1* регистрируются по каналу флуоресценции FAM. Использование эндогенного внутреннего контроля позволяет контролировать основные этапы анализа (забор, транспортирование, хранение, выделение РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и непосредственно амплификации кДНК), а также точно рассчитывать количество мРНК гена *RUNX1-RUNX1T1*.

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Все работы выполняются только в одноразовых перчатках, которые используют и меняют при каждой операции (выделение РНК, постановка реакции обратной транскрипции 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 РНК:**

- QIAamp RNA Blood Mini Kit (50) (Cat No. 52304, Qiagen, Германия)
- Рибозоль Д (кат. номер К2-18-100, Interlabservice, Россия)

### **Варианты наборов реагентов для стабилизации РНК:**

- RNA stabilization buffer, 200 ml (Cat No. IG-RNA, Inogene, Россия)
- PAXgene Blood RNA Tubes (Cat No. 764114, Qiagen, Германия)

При выделении образцов с использованием реагентов для стабилизации РНК, может быть рекомендовано использование наборов PAXgene Blood RNA Kit (50) (Cat No. 762174, Qiagen, Германия) или Рибозоль Д (кат. номер К2-18-100, Interlabservice, 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)

### **Оборудование и расходные материалы**

ЗОНА 1. Этап выделения РНК

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 реакции обратной транскрипции и 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. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С;
5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
6. 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

1. Образец с ЭДТА. Материал помещают в пробирку типа Vacutainer (BD) с 6% раствором ЭДТА из расчета 1:20. 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 лизирующий раствор из комплекта реагентов для выделения РНК или Trizol Reagent (Cat No. [15596018](#), ThermoFisher Scientific). Данный образец допускается хранить до обработки при температуре не выше минус 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 (Qiagen) или Trizol 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.

## ВЫПОЛНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Реакционную смесь (PCRMix) и олигонуклеотиды (PrimerMix) необходимо хранить при температуре - 20 °С.

ДНК-калибраторы (C1...C5) целесообразно при первом использовании разделить на аликвоты, содержащие количество каждого компонента, необходимое для 2-3 реакций, и хранить при - 20 °С. Размороженные аликвоты ДНК-калибраторов рекомендуется хранить при + 4 °С (максимальный срок хранения - 3 недели).

Количество циклов заморозки-разморозки для ДНК-калибраторов не должно превышать трех.



1. Перед началом работы разморозьте PCR Mix и Primer Mix при комнатной температуре (в течение 15-30 мин). Перед применением смесей 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. Смешайте ПЦР-смеси для *RUNX1-RUNX1T1* и *ABL1* в отдельных микропробирках для ПЦР объемом 0,2 мл (куполообразная крышка). Расход реагентов на каждую реакцию:

Реактив	ПЦР-смесь RUNX1-RUNX1T1 (Объем, мкл)	ПЦР-смесь ABL1 (Объем, мкл)
PrimerMix RUNX1-RUNX1T1	1	-
PrimerMix ABL1	-	1
PCR Mix	10	10
H <sub>2</sub> O	9	9

Для каждого пациента рекомендуется ставить реакции *RUNX1-RUNX1T1* и *ABL1* в двух повторах.

В каждую постановку рекомендуется ставить дополнительную контрольную пробирку без добавления ДНК-матрицы (NTC-контроль) для каждого из наборов праймеров.

3. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавьте по 5 мкл образца кДНК в пробирку с реакционной смесью *RUNX1-RUNX1T1*, затем в пробирку с реакционной смесью *ABL1*;
4. Необходимо поставить по 5 контрольных образцов-калибраторов для смеси *RUNX1-RUNX1T1* и *ABL1*. Для этого в 5 микропробирок для *RUNX1-RUNX1T1* и 5 микропробирок для *ABL1* внесите 5 мкл соответствующего ДНК-калибратора (C1, C2, C3, C4, C5);
5. Поместите микропробирки в амплификатор;  
На рисунках 2 и 3 представлены примеры схем расположения пробирок в амплификаторах из расчета на 8 тестов (8 проб пациентов)



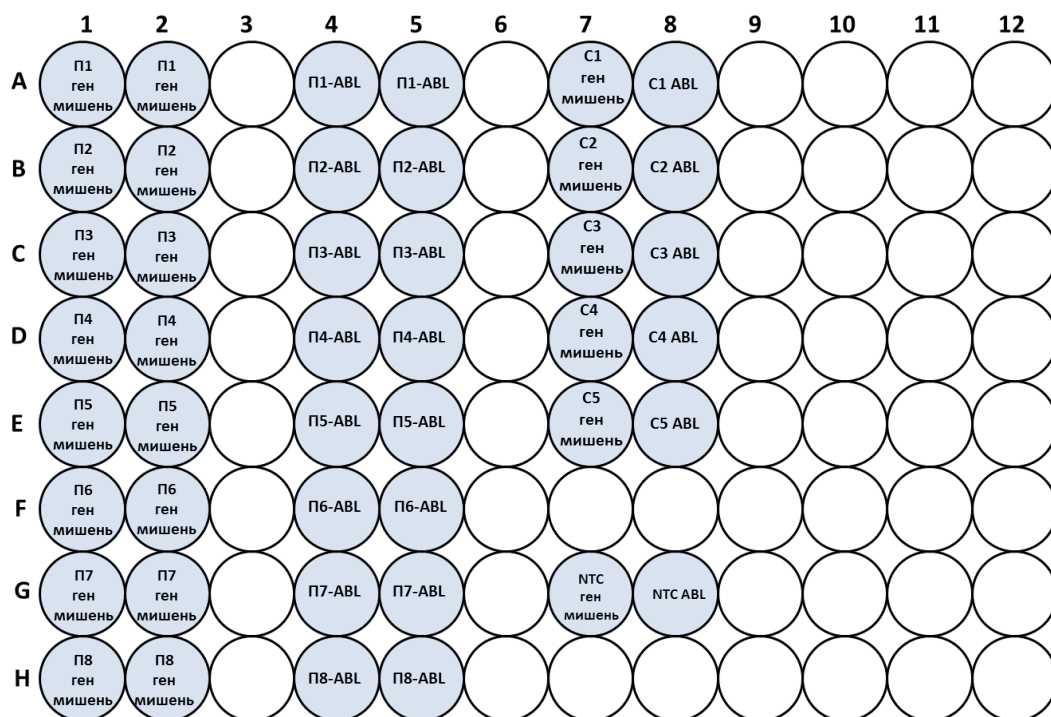


Рисунок 1. Пример схемы расположения пробирок в амплификаторе на 8 тестов амплификации для термоциклеров «iQ iCycler» (Bio-Rad) и «Quantstudio» (Applied Biosystem) П – кДНК пациента, С – ДНК-калибратор, NTC – контроль без матрицы

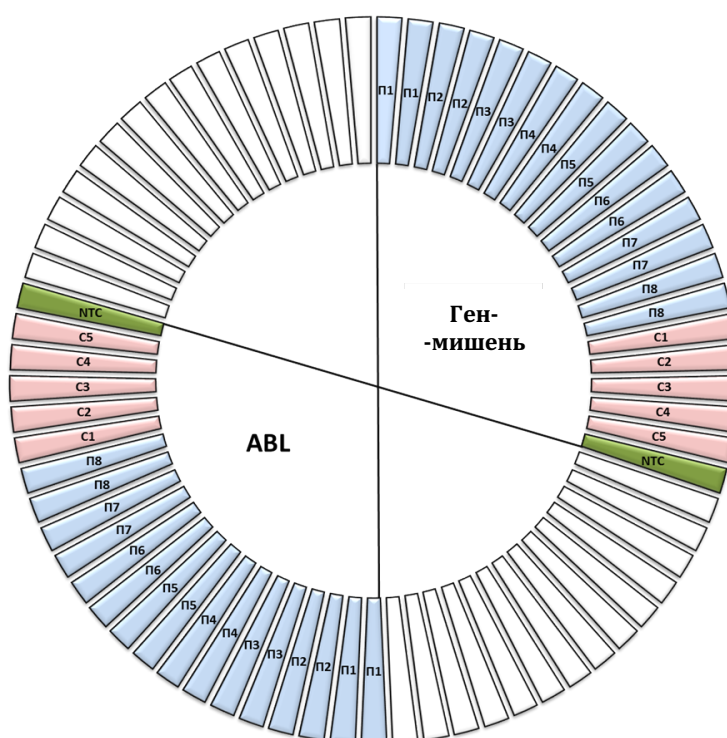


Рисунок 2. Пример схемы расположения пробирок в амплификаторе «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия) на 8 тестов.

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

6. Запрограммируйте прибор для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала:

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

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Повторов
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	15 с	-	50
	60	60 с	FAM	

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

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Повторов
Hold	95	15 мин	-	1
Cycling	95	15 с	-	45
	60	45 с	FAM	

## 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 *RUNX1-RUNX1T1* регистрируют накопление продукта амплификации участка кДНК *RUNX1-RUNX1T1*, в пробирках с ПЦР-смесью *ABL1* – кДНК гена-нормализатора *ABL1*.

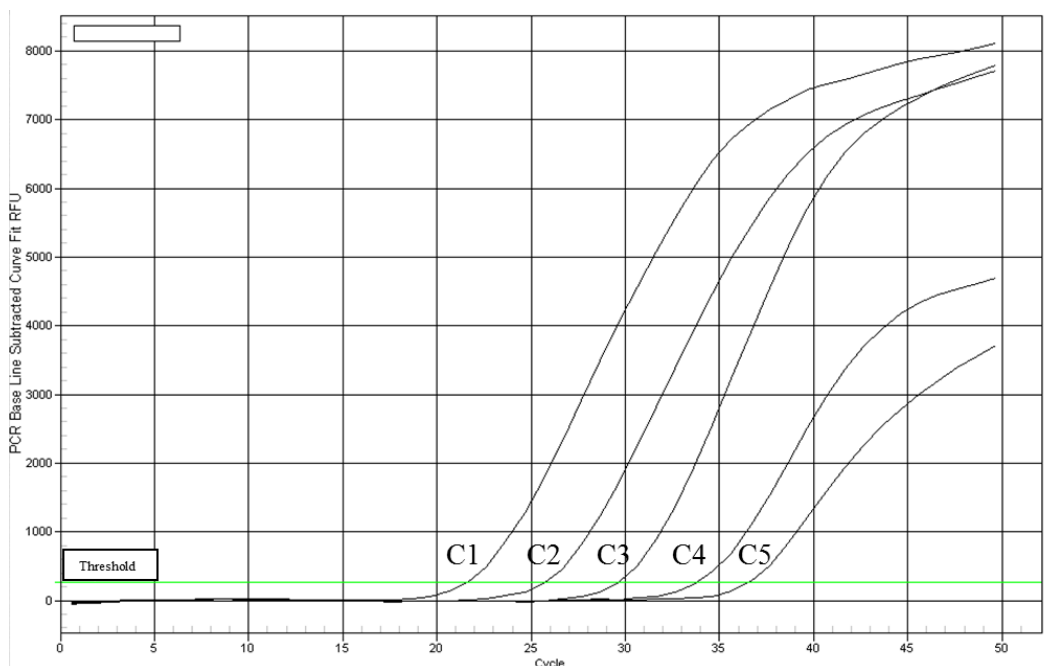


Рисунок 3. Накопление продукта амплификации ДНК-калибраторов в пробирках с ПЦР-смесью

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 *RUNX1-RUNX1T1*, затем для смеси *ABL1* происходит автоматическое построение калибровочной кривой и расчет значений копийности *RUNX1-RUNX1T1* и *ABL1* в образце ПЦР (см. руководство к соответствующему термоциклеру для ПЦР в реальном времени).

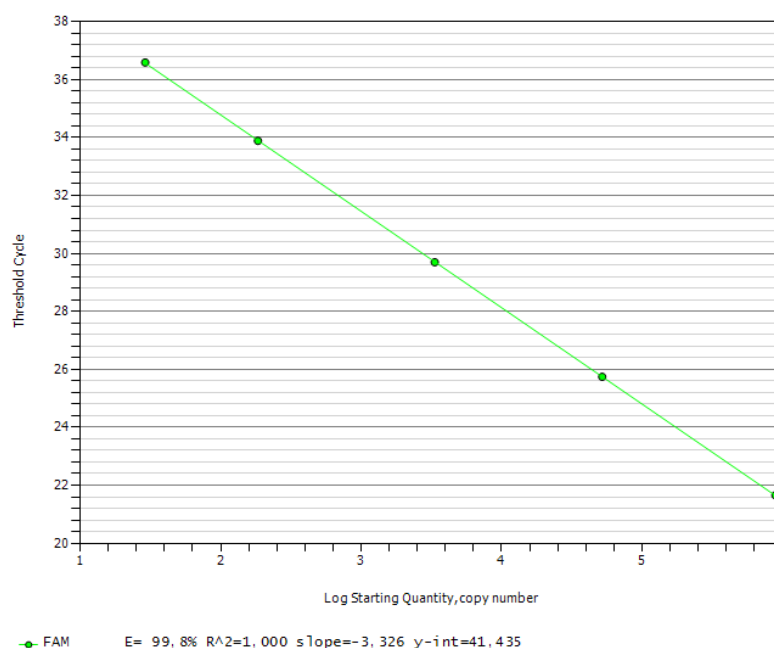


Рисунок 4. Пример калибровочной кривой на приборе «iQ5 iCycler» (Bio-Rad)

Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации копий *RUNX1-RUNX1T1* в исследуемых и контрольных образцах по следующей схеме:

1. Рассчитать отношение для всех образцов

Число копий кДНК *RUNX1-RUNX1T1* / число копий кДНК *ABL1*

2. Рассчитать среднее значение отношения концентраций *RUNX1-RUNX1T1* /*ABL1* для двух повторов образца, умножить полученный результат на 100.

## КРИТЕРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Критерий	Допустимые значения/результаты
Отклонение Ct между повторами	$\leq 2$ (при среднем значении Ct $>36$ ) $\leq 1,5$ (при среднем значении Ct $\leq 36$ )
Угловой коэффициент стандартной кривой (Slope)	между -3,0 и -3,9 (при эффективности ПЦР 100% Slope= -3,32)
Коэффициент корреляции ( $R^2$ ) 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> <sub>кк</sub> )	<i>ABL1</i> <sub>кк</sub> $> 10\ 000$ для достижения оптимальной чувствительности
Отрицательные контроли без добавления матрицы (NTC) для <i>RUNX1-RUNX1T1</i> и <i>ABL1</i>	Не должны детектироваться



**ВАЖНО!** Результаты не подлежат учету если:

1. Значение концентрации *ABL1* (ген-нормализатор) менее 10000 копий / реакция: образец не валидный, требуется перестановка данного образца, начиная с первого этапа анализа. В случае воспроизведения результата требуется перезабор материала.
2. Отличие отношений концентрации *RUNX1-RUNX1T1 / ABL1* для двух повторов одного образца более чем четырехкратное. Т.е.  $(\text{повтор-1 } RUNX1-RUNX1T1 / ABL1) / (\text{повтор-2 } RUNX1-RUNX1T1 / ABL1) > 4$  или  $< 0,25^*$   
\*За исключением образцов, для которых измеренное число копий *RUNX1-RUNX1T1* менее 25.
3. Коэффициент корреляции  $R^2$  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.

**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. 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.
4. 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.



5. Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T, Baer MR, Strout MP, Oberkircher AR et al. Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 1996;88: 2183–2191.
6. Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T, Akashi T et al. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 1996; 87: 4789–4796.

