WT1&BAALC RQ Kit, 48 тестов

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов **WT1&BAALC RQ Kit, 48 тестов** для количественного определения уровня экспрессии генов *WT1* (Wilms tumor 1) в тотальной РНК пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ, AML) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-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

На сегодняшний день мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) среди пациентов с ОМЛ с помощью молекулярно-биологических методов является наиболее важным методом в оценке эффективности терапии. Однако применимость данного подхода ограничена наличием у пациентов подходящих для детекции с помощью количественной ПЦР в режиме «реального времени» молекулярно-биологических маркеров, характерных для лейкемических клеток, таких как химерные гены *PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *AML1-ETO* (*RUNX1-RUNX1T1*) или специфические мутации в генах *FLT3* и *NPM1*.

Около половины больных ОМЛ лишены подобных молекулярно-генетических маркеров. Именно для этой группы пациентов разработка альтернативных подходов к мониторингу МОБ является ключевым фактором в оценке эффективности терапии. Одним из таких подходов является использование количественной ПЦР в режиме «реального времени» для детекции транскриптов генов, экспрессия которых значительно выше в лейкозных клетках по отношению к нормальным клеткам костного мозга и периферической крови. Наиболее ярким примером такого гена является *WT1* (Wilms tumor 1).

Ген *WT1* расположен в 11p13 и кодирует транскрипционный фактор типа «цинковые пальцы», выполняющий в клетке целый спектр функций в зависимости от варианта сплайсинга мРНК. Одной из основных функций *WT1* в ходе нормального гемопоэза является индукция дифференцировки гепомоэтических стволовых клеток в миело-моноцитарном направлении (1). Также *WT1* в норме является опухолевым супрессором и отвечает за созревание мРНК.

Гиперэкспрессия гена *WT1* была обнаружена при ряде заболеваний крови опухолевой природы, в том числе и при ОМЛ (2). Высокая экспрессия *WT1* встречается у более чем половины пациентов с ОМЛ и является фактором неблагоприятного прогноза заболевания и высокого риска развития рецидива (3). Поскольку методом количественной ПЦР в режиме «реального времени» можно выявить четкие различия в уровне транскрипта *WT1* в нормальных и лейкозных клетках, экспрессия *WT1* может являться полезным маркером МОБ у пациентов при отсутствии крупных хромосомных аномалий или других мутаций, характерных для клеток лейкозного клона.

Набор предназначен для использования исключительно в исследовательских целях.

СОСТАВ НАБОРА

Комплект реагентов «**WT1 RQ Kit, 24 tests**» включает:

Реактив			Описание	Объем (мкл)	Кол-во
ДНК-калибраторы	ABL1/WT1	C1 ABL1 / WT1	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C2 ABL1 / WT1	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C3 ABL1 / WT1	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C4 ABL1 / WT1	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
		C5 ABL1 / WT1	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 пробирка
нуклеотиды	WT1	PrimerMix WT1	Прозрачная окрашенная жидкость	75	1 пробирка
	ABL1	PrimerMix ABL1	Прозрачная окрашенная жидкость	75	1 пробирка
ПЦР Мастер-микс		PCR Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	790	1 пробирка
Вода стерильная деионизированная		Water	Прозрачная бесцветная жидкость	565	1 пробирка

ДНК-калибраторы (C1, C2, C3, C4, C5) – представляют собой количественно охарактеризованные препараты плазмидной ДНК, содержащие вставки кДНК *WT1* и участков генов-нормализаторов *ABL1* и *GUSB*. Используются для построения калибровочной кривой ПЦР для *WT1* и *ABL1*, а также в качестве положительных контролей ПЦР.

Результат амплификации кДНК *WT1* 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) и реакционную смесь (PCRMix) необходимо хранить при температуре - 20°С.
- ДНК-калибраторы (C1...C5) необходимо хранить при температуре + 4°С (срок хранения - 4 месяца).

1. Перед началом работы разморозьте PrimerMix и PCRMix 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 микропробирки 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 WT1	1	26	28
PrimerMix ABL1	1	26	28
PCR Mix	10,5	273	294
H_2O	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).

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 (**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, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во повторов
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	15 с	-	50
	60	60 с	FAM/JOE/HEX	

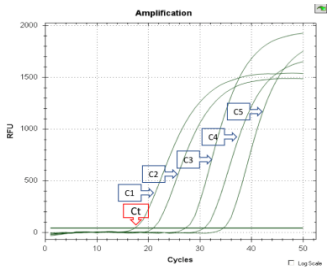
Таблица 3. *Программа амплификации для «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)*

Этап	Температура, °С	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 *WT1* и участка кДНК гена-нормализатора *ABL1*.



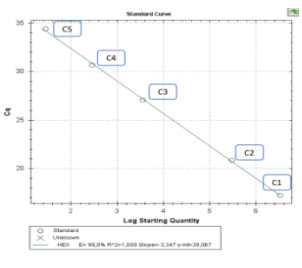


Рисунок 3. Накопление продукта амплификации

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 *WT1* и *ABL1* в образце (см. руководство к соответствующему термоциклеру для ПЦР в реальном времени).

Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации копий *WT1* в исследуемых и контрольных образцах по следующей схеме:

1. Рассчитать отношение для всех образцов:
Число копий кДНК *WT1* / число копий кДНК *ABL1*
2. Рассчитать среднее значение отношения концентраций *WT1 /ABL1* для двух повторов образца, умножить полученный результат на 10000.
3. **При относительной экспрессии *WT1* ≤ 250 результат следует считать отрицательным.**

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 С5 или С4 (для гена *ABL1*)	Должно детектироваться и включаться в стандартную кривую
Контроль качества пробы пациента по количеству копий *ABL1* на реакцию (*ABL1* кк)	*ABL1* кк> 10 000 для достижения оптимальной чувствительности
Отрицательные контроли без добавления матрицы (NTC) для *WT1* и *ABL1*	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 *WT1 /ABL1* для двух повторов одного образца более чем четырехкратное. Т.е. (повтор-1 *WT1 /ABL1*) / (повтор-2 *WT1 /ABL1*) > 4 или < 0,25*
*За исключением образцов, для которых измеренное число копий *WT1* менее 25.
3. Коэффициент детерминации 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.

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Дополнительную информацию можно получить в следующих источниках:

1. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. Leukemia. 2007 May;21(5):868-76. Epub 2007 Mar 15.
2. Leif W. Ellisen, Nadia Carlesso, Tao Cheng, David T. Scadden, and Daniel A. Haber The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. EMBO J. 2001 Apr 17; 20(8): 1897–1909.
3. Liu-Yin, J. et al. (2008) Predictive value of minimal residual disease (MRD) monitoring by RQ-PCR in WT1 positive patients entered in the UK MRC AML-15 Trial. Blood 112, 259.
4. GabertJ,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.
5. 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.
6. 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 *WT1* 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 *WT1* 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@inogene.ru