



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов **RQ Kit ETV6-RUNX1 (TEL-AML1, (t(12;21)(p13;q22))** для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *ETV6-RUNX1* и мРНК гена *ABL* в клиническом материале пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) 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 транслокация $t(12;21)(p13;q22)$, продуктом которой является химерный транскрипт *ETV6 (TEL) - RUNX1 (CBFA2, AML1)*, обнаруживается примерно в 25% случаев детской В-клеточной лимфобластной лейкемии – наиболее распространённом варианте острой лимфобластной лейкемии (ОЛЛ). Гены *TEL* и *AML* кодируют ядерные транскрипционные факторы, играющие критическую роль в нормальном гемопоэзе. Их слияние ведет к возникновению и развитию лейкоза путем нарушения нормальной функции *TEL* и/или снижения уровня экспрессии гена *AML1*. Существует два типа транслокации *TEL-AML1*: основной вариант возникает при локализации точки разрыва гена *AML* в интроне 1 и гена *TEL* в интроне 5, другой, менее распространённый вариант (10% среди всех *TEL-AML1* случаев), образуется путем разрыва во 2 интроне *AML1* и 5 интроне гена *TEL* (см. Рис.1).

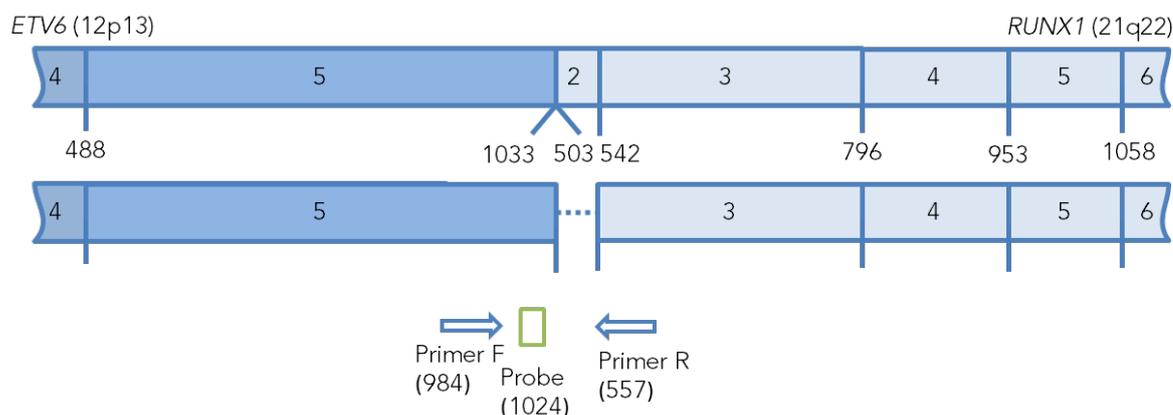


Рисунок 1. Схема образования химерных транскриптов *ETV6 (TEL) - RUNX1 (CBFA2, AML1)*. Обозначены места связывания праймеров и зондов для ПЦР-РВ. Положения праймеров и зондов указаны относительно 5'-конца нуклеотидных последовательностей нормальных транскриптов.

Химерный транскрипт *ETV6-RUNX1* считается маркером благоприятного прогноза и длительной ремиссии для пациентов с ОЛЛ, и соответственно, является важной мишенью при диагностике и мониторинге 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 *ETV6-RUNX1* 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 «ETV6-RUNX1 RQ Kit, 24 tests» включает:

Реактив		Описание	Объем (мкл)	Кол-во	
ДНК- калибраторы	ETV6-RUNX1	C1 ETV6-RUNX1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C2 ETV6-RUNX1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C3 ETV6-RUNX1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C4 ETV6-RUNX1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C5 ETV6-RUNX1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
	ABL	C1 ABL	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C2 ABL	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C3 ABL	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C4 ABL	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
		C5 ABL	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 пробирка
Олиго- нуклеотиды	ETV6-RUNX1	PrimerMix ETV6-RUNX1	Прозрачная окрашенная жидкость	70	1 пробирка
	ABL	PrimerMix ABL	Прозрачная окрашенная жидкость	70	1 пробирка
ПЦР Мастер-микс		PCR Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	875	2 пробирки
Вода стерильная деионизированная		H ₂ O	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	1 пробирка

ДНК-калибраторы (C1, C2, C3, C4, C5) – представляют собой количественно охарактеризованные препараты плазмид, содержащих вставку кДНК *ETV6-RUNX1* или участка гена-нормализатора *ABL*. Используются для построения калибровочной кривой ПЦР для обеих ПЦР-смесей *ETV6-RUNX1* и *ABL*, а также в качестве положительных контролей ПЦР.



НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *ETV6-RUNX1* и мРНК гена *ABL* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов может быть использован для выявления случаев ОЛЛ, ассоциированного с хромосомной перестройкой *ETV6-RUNX1*, для подтверждения диагноза ОЛЛ 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 уровня экспрессии гена *ETV6-RUNX1* 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'-карбоксихлорофлуоресцеин) 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 *ETV6-RUNX1* и фрагмента мРНК области сплайсинга гена *ABL* (рекомендован рабочей группой «Еurope Against Cancer», EAC), в качестве эндогенного внутреннего контроля и гена-нормализатора.

Результат амплификации кДНК *ETV6-RUNX1* регистрируется по каналу флуоресценции FAM, результат амплификации *ABL* регистрируется по каналу Yellow/JOE/HEX/R6G. 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 *ETV6-RUNX1*.

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 K2-18-100, 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 K2-18-100, 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

1. Разморозьте все реактивы и поместите их на лед
2. Перемешайте на вортексе основные компоненты реакции.
3. Смешайте ПЦР-смеси для *ETV6-RUNX1* и *ABL* в отдельных микропробирках для ПЦР объемом 0,2 мл (куполообразная крышка). Расход реагентов на каждую реакцию:

Реактив	ПЦР-смесь ETV6-RUNX1 (Объем, мкл)	ПЦР-смесь ABL (Объем, мкл)
PrimerMix ETV6-RUNX1	1	-
PrimerMix ABL	-	1
PCR Mix	12,5	12,5
H ₂ O	до 20 мкл	до 20 мкл

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

Для каждого пациента рекомендуется ставить реакции *ETV6-RUNX1* и *ABL* в двух повторях.

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 *ETV6-RUNX1*, затем в пробирку с реакционной смесью *ABL*;
4. Необходимо поставить по 5 контрольных образцов-калибраторов для смеси *ETV6-RUNX1* и *ABL*. Для этого в 5 микропробирок для *ETV6-RUNX1* и 5 микропробирок для *ABL* 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)

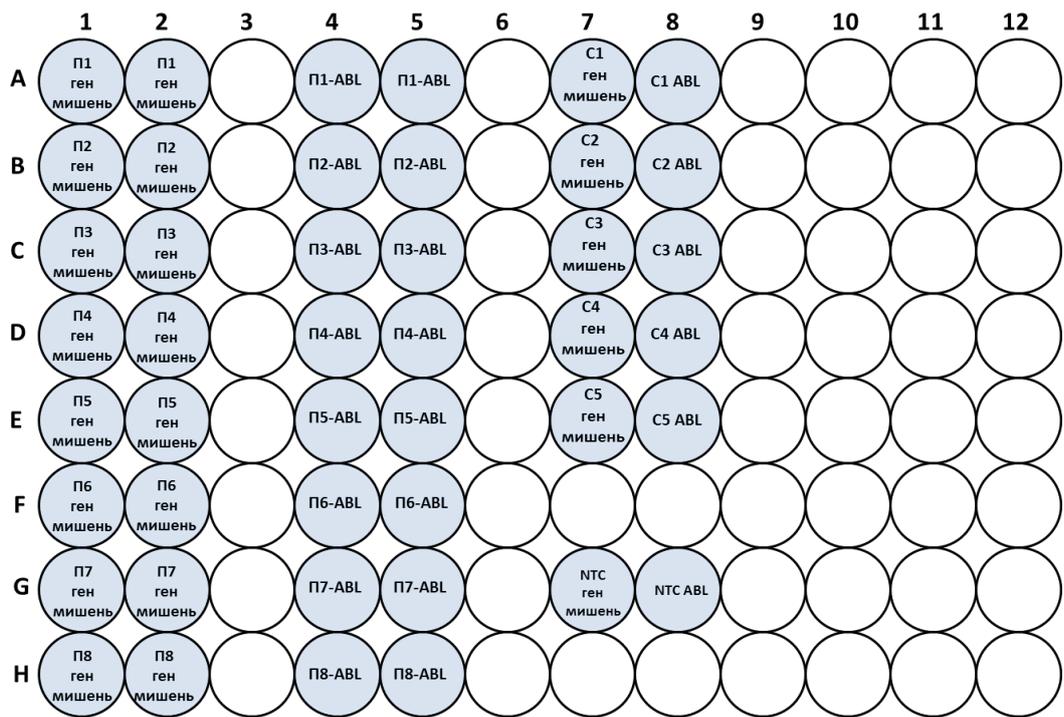


Рисунок 1. Пример схемы расположения пробирок в амплификаторе на 8 тестов амплификации для термоциклеров «iQ iCycler» (Bio-Rad) и «Quantstudio» (Applied Biosystem). Пn (n=1-8) – кДНК пациента, С – ДНК-калибратор, NTC – контроль без матрицы

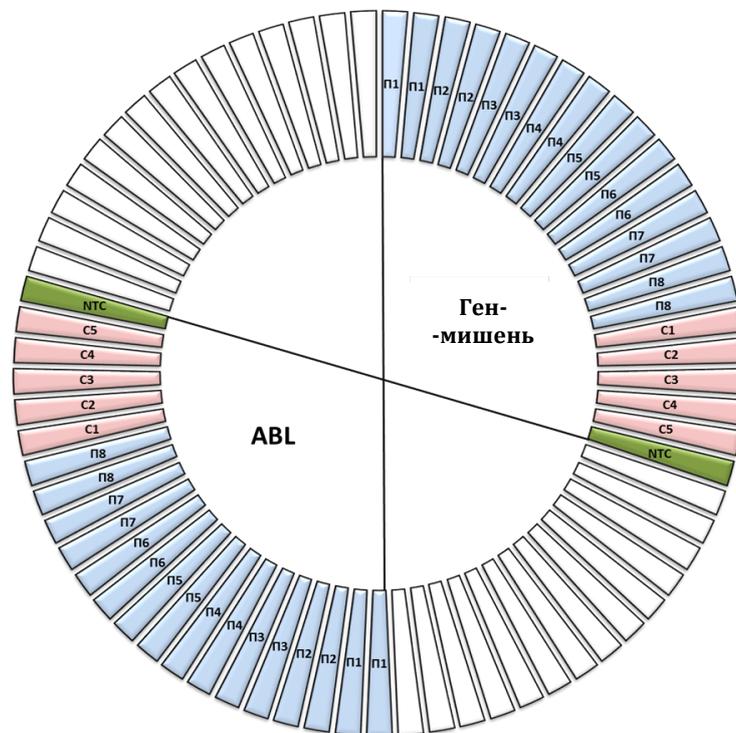


Рисунок 2. Пример схемы расположения пробирок в амплификаторе «Rotor-Gene» 3000/6000 с ротором на 72 пробирки («Corbett Research», Австралия) на 8 тестов.

Pn (n=1-8) – кДНК пациента, С – ДНК-калибратор, NTC – контроль без кДНК-матрицы

6. Запрограммируйте прибор для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала:
7. 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	50	2 мин	-	1
Hold	95	10 мин	-	1
Cycling	95	15 с	-	50
	60	1 мин	FAM/JOE/HEX	

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/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 *ETV6-RUNX1* регистрируют накопление продукта амплификации участка кДНК *ETV6-RUNX1*, в пробирках с ПЦР-смесью *ABL* – кДНК гена-нормализатора *ABL*.

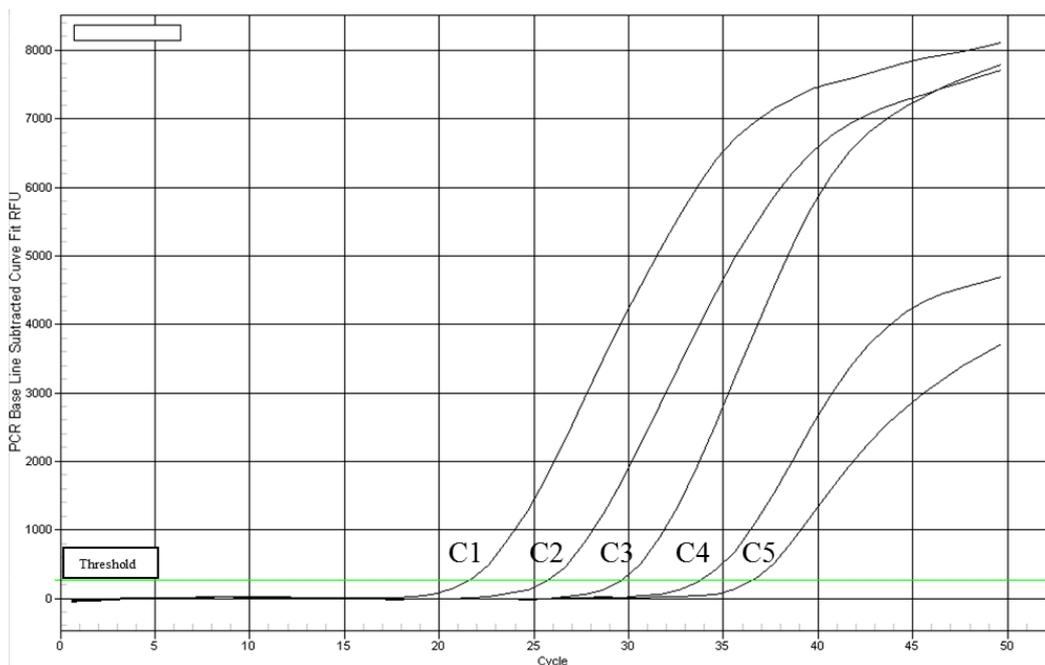


Рисунок 3. Накопление продукта амплификации ДНК-калибраторов в пробирках с ПЦР-смесью

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 *ETV6-RUNX1*, затем для смеси *ABL* происходит автоматическое построение калибровочной кривой и расчет значений копийности *ETV6-RUNX1* и *ABL* в образце ПЦР (см. руководство к соответствующему термоциклеру для ПЦР в реальном времени).

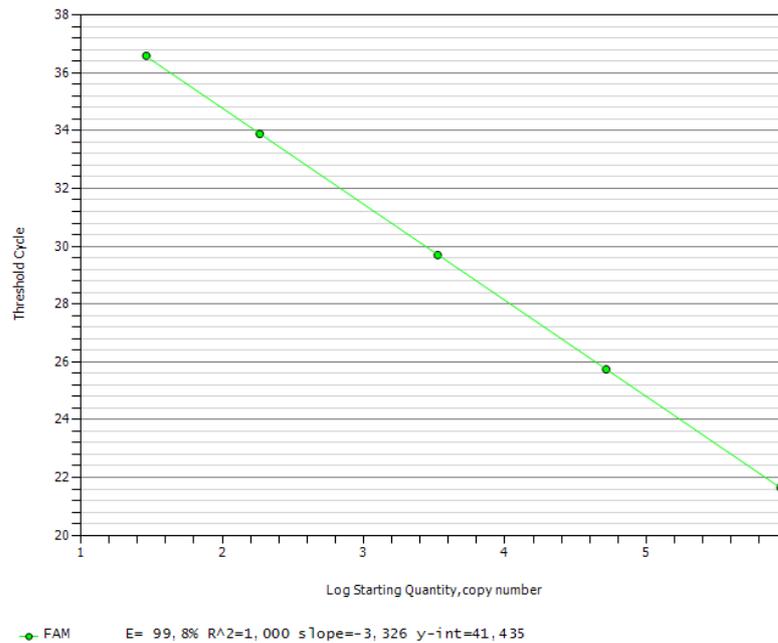


Рисунок 4. Пример калибровочной кривой на приборе «iQ5 iCycler» (Bio-Rad)

Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации копий *ETV6-RUNX1* в исследуемых и контрольных образцах по следующей схеме:

1. Рассчитать отношение для всех образцов

Число копий кДНК *ETV6-RUNX1* / число копий кДНК *ABL*

2. Рассчитать среднее значение отношения концентраций *ETV6-RUNX1 / ABL*

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) $\leq 1,5$ (при среднем значении Ct ≤ 36)
Угловой коэффициент стандартной кривой (Slope)	между -3,0 и -3,9 (при эффективности ПЦР 100% Slope= -3,32)
Коэффициент корреляции (R^2) для стандартной кривой	> 0.98
Минимальное стандартное разведение C5 или C4 (для гена <i>ABL</i>)	Должно детектироваться и включаться в стандартную кривую
Контроль качества пробы пациента по количеству копий <i>ABL</i> на реакцию (<i>ABL</i> _{кк})	<i>ABL</i> _{кк} $> 10\ 000$ для достижения оптимальной чувствительности
Отрицательные контроли без добавления матрицы (NTC) для <i>ETV6-RUNX1</i> и <i>ABL</i>	Не должны детектироваться

ВАЖНО! Результаты не подлежат учету если:

1. Значение концентрации *ABL* (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 *ETV6-RUNX1* /*ABL* для двух повторов одного образца более чем четырехкратное. Т.е. (повтор-1 *ETV6-RUNX1* /*ABL*) / (повтор-2 *ETV6-RUNX1* /*ABL*) > 4 или $< 0,25^*$
*За исключением образцов, для которых измеренное число копий *ETV6-RUNX1* 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. Drunat S, Olivi M, Brunie G, Grandchamp B, Vilmer E, Bieche I et al. Quantification of TEL-AML1 transcript for minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 114: 281–289
6. Seeger K, Kreuzer KA, Lass U, Taube T, Buchwald D, Eckert C et al. Molecular quantification of response to therapy and remission status in TEL-AML1-positive childhood ALL by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Cancer Res* 2001; 61: 2517–2522
7. Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H, Hokland P. Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 355–365

