

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени для выявления интенсивности экспрессии химерного онкогена человека *BCR-ABL* типа p210 (ОНКОСКРИН 1-1-Q)

ВВЕДЕНИЕ

Химерный ген *BCR-ABL* образуется в результате реципрокной транслокации t(9;22)(q34;q11). При этой транслокации возникает Филадельфийская хромосома (Ph'), которая является специфическим цитогенетическим маркером хронического миелолейкоза (ХМЛ) и выявляется также у 10–20% взрослых и 2–5% детей, больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), и примерно в 2% острого миелобластного лейкоза (ОМЛ).

Существует три основных варианта гибридного гена *BCR-ABL*, в зависимости от расположения точек разрыва в гене *BCR*: p210 (M-bcr), p190 (m-bcr), p230 (μ-bcr). Почти во всех случаях ХМЛ встречается вариант p210 *BCR-ABL*. Ген *BCR-ABL* кодирует белок с нерегулируемой тирозинкиназной активностью, функционирование этого белка играет решающую роль в патогенезе заболевания.

Молекулярный мониторинг экспрессии *BCR-ABL* методом ПЦР в реальном времени является в настоящее время обязательным методом контроля лечения ХМЛ у пациентов на терапии ингибиторами тирозинкиназ. Достижение определенного уровня экспрессии *BCR-ABL* - большого молекулярного ответа - включено международным консорциумом European Leukemia Net в критерии показателей оптимальной терапии и является важным прогностическим фактором безрецидивной выживаемости больных ХМЛ [Vaccarani M, et al, 2009, Palandri F, et al, 2009].

Транслокация t(9;22) у больных острыми лейкозами является признаком плохого прогноза. Вариант p210 *BCR-ABL* встречается примерно у половины взрослых больных с ОЛЛ и у большинства больных ОМЛ, которые являются Ph'-позитивными. Выявление экспрессии гена *BCR-ABL* у больных острыми лейкозами является необходимым компонентом дифференциальной диагностики, которая определяет схему терапии заболевания. Определение уровня экспрессии *BCR-ABL* позволяет проводить мониторинг минимальной остаточной болезни, оценивать ответ пациента на проводимую терапию.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Набор реагентов ОНКОСКРИН 1-1-Q предназначен для выявления интенсивности экспрессии химерного онкогена человека *BCR-ABL* типа p210 (M-BCR) методом ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan.
- 1.2. Набор предназначен только для применения in vitro.
- 1.3. Тест-система позволяет определять экспрессию *BCR-ABL* типа p210 в образцах кДНК, полученных из периферической крови и костного мозга больных хроническим миелолейкозом, Ph'-позитивными острыми лейкозами и может применяться для дифференциальной диагностики, мониторинга минимальной остаточной болезни, оценки ответа на терапию.
- 1.4. Набор ОНКОСКРИН 1-1-Q рассчитан на проведение 400 реакций ПЦР в реальном времени для анализа 100 клинических образцов в повторах, построения калибровочных кривых из 5 десятикратных разведений проб положительного контроля (14 серий по 2 повтора или 9 серий по 3 повтора), для постановки проб отрицательного контроля. Анализируемым материалом является комплементарная ДНК (кДНК).
- 1.5. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

2.1. Принцип действия.

Количественное определение экспрессии химерного онкогена p210 *BCR-ABL* основано на трех последовательных операциях:

- выделение тотальной РНК из клинических образцов по методу Хомчинского (Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9).
- проведение реакции обратной транскрипции с получением к-ДНК.
- проведение реакции амплификации в режиме реального времени, совмещенной с детекцией продуктов реакции, для гена p210 *BCR-ABL* и контрольного гена.

Метод ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan основан на использовании специфического олигонуклеотидного зонда с флуоресцентным красителем и гасителем флуоресценции, а также термостабильной полимеразы, обладающей 5'-экзонуклеазной активностью. При проведении ПЦР-амплификации данная активность фермента разрушает олигонуклеотидный зонд, связанный с матрицей, высвобождая флуорофор. Уровень флуоресценции пропорционален количеству исходной матрицы. Число копий гена p210 *BCR-ABL* в клинических образцах определяется по калибровочной кривой, которая строится по стандартам с известной концентрацией.

Экспрессия *BCR-ABL* вычисляется относительно экспрессии контрольного гена (гена сравнения). В качестве контрольного гена могут применяться гены *ABL*, *BCR*, $\beta 2$ микроглобулин и другие гены «домашнего хозяйства». Использование контрольного гена позволяет нормализовать экспрессию *BCR-ABL*, нивелировать различия в количестве генетического материала в образцах и оценить его качество.

Внимание! Реактивы для выделения тотальной РНК и получения кДНК, и реактивы для определения уровня экспрессии контрольного гена в состав набора ОНКОСКРИН 1-1-Q не входят.

2.2. Состав набора.

В состав набора ОНКОСКРИН 1-1-Q входит 12 пробирок различного объема, содержащих готовые к применению реагенты:

Таблица 1

Название пробирки	Компонент	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Буфер 2х	Буфер для ПЦР 2х	Пластиковые пробирки вместимостью 2 мл с фиолетовой крышкой	3	1800
ДНК-полимераза	ДНК-полимераза	Пластиковая пробирка вместимостью 0,5 мл с прозрачной крышкой	1	100
Деионизованная вода	Деионизованная вода	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с прозрачной крышкой	1	1500
Смесь праймеров <i>BCR-ABL</i> p210 10х	Смесь праймеров <i>BCR-ABL</i> p210 10х	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с зеленой крышкой	1	1100
Зонд <i>BCR-ABL</i> p210 10х	Зонд <i>BCR-ABL</i> p210 10х	Пластиковая пробирка вместимостью 2 мл с красной крышкой	1	1100
$10^2/5$, $10^3/5$, $10^4/5$, $10^5/5$, $10^6/5$	Положительный контроль, десятикратные разведения: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 копий гена в 5 мкл	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с оранжевой крышкой	5	160

Пробирки с компонентами набора установлены в пластиковый или картонный штатив, пробирка «Зонд *BCR-ABL* p210 10х» обернута фольгой и помещены в герметично закрывающийся прозрачный пакет из полипропилена. Штатив с компонентами набора и пакет с зондом помещены в картонную коробку. Коробка с набором и инструкция по применению помещены в герметично закрывающийся прозрачный пакет из полипропилена.

2.3. Аналитические и диагностические характеристики.

Чувствительность:

- Воспроизводимая чувствительность - не более 10 копий гена *BCR-ABL* на реакцию, минимальная чувствительность составляет 1 копию гена *BCR-ABL* на реакцию.
- Чувствительность, определенная как количество тотальной РНК, выделенной из клинического образца, составляет не более 10 нг в пересчете на одну ПЦР реакцию.

Специфичность:

- Наличие специфического флуоресцентного сигнала только в образцах, содержащих кДНК типа p210 гена *BCR-ABL*, и отсутствие флуоресцентного сигнала в образцах, содержащих кДНК любой другой нуклеотидной последовательности, в том числе к-ДНК типов p190 и p230 гена *BCR-ABL*
- Положительный контроль прохождения ПЦР в реальном времени - наличие специфического флуоресцентного сигнала в лунках (пробирках), соответствующих пробам положительного контроля после проведения ПЦР с добавлением контрольной ДНК, с эффективностью ПЦР реакции в пределах 1,05-0,95 (95-105%).
- Отрицательный контроль проведения ПЦР в реальном времени - отсутствие специфического флуоресцентного сигнала в лунках (пробирках), соответствующих пробам отрицательного контроля, после проведения ПЦР без добавления кДНК.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 3.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.
- 3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 3.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».
- 3.4. Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.
- 3.5. Работу с набором реагентов и анализируемыми клиническими образцами следует проводить в халатах и одноразовых медицинских перчатках без талька.
- 3.6. Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.
- 3.7. Постановку ПЦР следует проводить в боксе. Всё лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
- 3.8. Работу с положительными контролями рекомендуется проводить в помещении, отдельном от места работы с остальным набором реактивов.
- 3.9. Все работы должны выполняться только с использованием одноразовых наконечников с фильтром для полуавтоматических пипеток. Пробирки и наконечники должны быть свободны от нуклеаз (маркировка «DNase/RNase free»).
- 3.10. В помещении, где проводится постановка ПЦР, поверхности рабочих столов и боксы обязательно должны облучаться ультрафиолетовым светом до начала и после окончания работ.
- 3.11. Лабораторная посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 3.12. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

4.1. Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором:

- ПЦР-бокс;
- ПЦР амплификатор в реальном времени, имеющий канал флуоресцентной детекции JOE/HEX (поглощение 515-545 нм, флуоресценция 560-585 нм) с присоединенным компьютером;
- микроцентрифуга/вортекс;
- пробирки пластиковые вместимостью 0,5 или 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: 0,5-10 мкл, 5-50 мкл и 20-200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штативы для пробирок 0,5мл, 1,5 мл и 2,0 мл «рабочее место»;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 1-10 мкл; 1-100 мкл; 1-200 мкл;
- 96-луночные или 48-луночные планшеты из оптически прозрачного бесцветного пластика или пробирки пластиковые объемом 0,2 мл/стрипы из оптически прозрачного бесцветного пластика в зависимости от типа амплификатора;
- пленка полимерная оптически прозрачная для ПЦР плашек или крышки для стрипов в зависимости от типа амплификатора;
- холодильник фармацевтический типа Sanyo MPR-414F или бытовой с морозильной камерой, температура морозильной камеры не выше минус 18⁰С;
- перчатки медицинские.

4.2. Анализируемые образцы.

Анализируемым материалом является кДНК, полученная из тотальной РНК клинических образцов в реакции обратной транскрипции. При проведении ПЦР анализа рекомендуется использование 10-200 нг тотальной РНК в пересчете на одну ПЦР реакцию. Тотальная РНК может быть получена из периферической крови и костного мозга.

ПЦР в реальном времени для каждого образца проводится в 2-3 повторах. Помимо клинических образцов, в каждую реакцию включаются стандарты с известным числом копий исследуемого гена, отрицательный контроль реакции обратной транскрипции (К-ОТ) и отрицательный контроль ПЦР реакции (К-).

Внимание! Реактивы для выделения тотальной РНК и получения кДНК и реактивы для определения уровня экспрессии контрольного гена в состав набора ОНКОСКРИН 1-1-Q не входят.

5. ПОРЯДОК РАБОТЫ

5.1. Проведение анализа.

5.1.1. Извлечь набор из холодильника, достать пробирки «Буфер 2х», «Деионизованная вода», «Смесь праймеров *BCR-ABL* p210 10х», «Зонд *BCR-ABL* p210 10х», контроль: 5 десятикратных разведений «10²/5», «10³/5», «10⁴/5», «10⁵/5», «10⁶/5», и установить их в штатив. Убрать оставшиеся компоненты набора в холодильник. Выдержать компоненты набора при комнатной температуре (от 18⁰С до 25⁰С) в течение 15-30

минут (с учётом полного размораживания). Все реагенты перед использованием тщательно перемешать, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 10 секунд при 1000 g.

5.1.2. Рассчитать, какое количество пробирок/стрипов/лунок необходимо для постановки реакции с учетом клинических образцов, пяти образцов десятикратных разведений положительного контроля и отрицательного контроля (не содержащего кДНК-матрицы) в повторах для каждого образца. Приготовить и промаркировать соответствующие пробирки/стрипы/лунки с учетом способа детекции используемого амплификатора. Приготовить пробирку для ПЦР-смеси.

5.1.3. Извлечь набор из холодильника, достать пробирку «Полимераза» и установить её в штатив.

5.1.4. Компоненты набора «Буфер 2х», «Деионизованная вода», «Смесь праймеров BCR-ABL p210 10х», «Зонд BCR-ABL p210 10х», положительный контроль (десятикратные разведения) и «ДНК-полимераза» готовы к использованию.

5.1.5. Приготовить смесь для ПЦР в указанной ниже последовательности и количестве:

«Буфер 2х»	12,5 мкл x (N+1)
«Смесь праймеров BCR-ABL p210 10х»	2,5 мкл x (N+1)
«Зонд BCR-ABL p210 10х»	2,5 мкл x (N+1)
«Деионизованная вода»	2,3 мкл x (N+1)
«ДНК-полимераза»	0,2 мкл x (N+1)

Общий объём: 20 мкл x (N+1), где N - число реакций (пробирок, лунок).

5.1.6. Полученную по п. 5.1.5. рабочую смесь для ПЦР тщательно перемешать, удалить со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) в течение 10 секунд при 1000 g.

5.1.7. В пробирки/стрипы/лунки, приготовленные согласно п. 5.1.2., добавить по 20 мкл смеси для ПЦР. Добавить в соответствующие пробирки/лунки по 5 мкл анализируемой кДНК, контрольной ДНК (из пробирок положительного контроля: десятикратные разведения «10²/5», «10³/5», «10⁴/5», «10⁵/5», «10⁶/5»). В пробирки/лунки с отрицательным контролем добавить по 5 мкл деионизованной воды. Конечный реакционный объем каждого образца должен составить 25 мкл.

5.1.8. Закрывать пробирки/стрипы, в случае использования плашек заклеить их полимерной пленкой.

5.1.9. Поместить пробирки в ПЦР амплификатор и провести амплификацию в режиме реального времени (методом полимеразной цепной реакции) по следующей программе:

Таблица 2

Температура	Время	Количество циклов	Регистрация флуоресценции
95 °C	10 мин	1	нет
95 °C	15 сек	50	нет
60 °C	60 сек		есть, канал R6G (Yellow)

Для более подробного описания процедуры проведения анализа необходимо использовать "Руководство по эксплуатации" для соответствующего ПЦР амплификатора.

5.2. Регистрация и учет результатов.

5.2.1. Для построения калибровочной кривой нужно использовать двукратные или трехкратные повторы разведений положительного контроля, концентрация которых составляет 10², 10³, 10⁴, 10⁵ и 10⁶ копий в 5 мкл.

5.2.2. По окончании ПЦР-амплификации в режиме реального времени для каждой пробы определяется значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает линию порога (Threshold) (Рис.1).

- 5.2.3. По значениям стандартов (положительных контролей) с известной концентрацией строится калибровочная кривая, по которой, исходя из значения порогового цикла в каждой пробирке/ лунке, определяется исходное число копий гена в каждом клиническом образце. Для более точного определения числа копий гена каждый клинический образец ставится в двух или трех повторах, для расчетов используется среднее значение числа копий. Построение калибровочной кривой и определение числа копий гена производится с помощью компьютерных программ, прилагаемых к ПЦР амплификатору.
- 5.2.4. Относительная экспрессия гена *BCR-ABL* в образце определяется как: среднее число копий гена *BCR-ABL* поделенное на среднее число копий контрольного гена и умноженное на 100%. В качестве контрольного гена может использоваться любой ген «домашнего хозяйства» - *ABL*, *BCR*, *GUSB*, $\beta 2$ микроглобулин и др.
- 5.2.5. При отсутствии флуоресцентного сигнала в образцах положительного контроля, а также при наличии флуоресцентного сигнала в образцах отрицательного контроля (не содержащих ДНК-матрицы) результаты реакции ПЦР в реальном времени признаются недействительными.
- 5.2.6. Значение коэффициента детерминации (R^2) должно быть не ниже 0,98, а эффективность реакции в пределах 1,05 -0,95 (95-105%).
- 5.2.7. Для ряда ПЦР амплификаторов в реальном времени (например, ABIPrizm 7500, фирма «Applied Biosystems») предполагается дополнительное использование пассивного референсного красителя при постановке ПЦР реакции. Референсный краситель в набор ОНКОСКРИН 1-1-Q не входит.
- 5.2.8. При расчете нужно учитывать следующее:
- 5.2.8.1. Линия порога устанавливается в начале линейной фазы флуоресценции. Для адекватного сравнения результатов, полученных в разных экспериментах, линия порога должна всегда иметь одинаковое значение и значения C_t для одинаковых стандартов не должны отличаться не более чем на 1 цикл. Для гена *BCR-ABL* и контрольного гена значения линии порога и C_t стандартов могут различаться.
- 5.2.8.2. Значение стандартного отклонения для порогового цикла для каждой анализируемой пробы не должно превышать 0,5. В случае превышения данного значения стандартного отклонения результат реакции для анализируемого образца признается недействительным, и реакцию ПЦР для этого образца необходимо переставить. Допустимо исключение из расчета среднего числа копий гена значений для одного из трех повторов анализируемого образца, в случае, если значение C_t для него значительно отличается от значений C_t для двух других повторов и значения C_t для этих двух оставшихся повторов близки (стандартное отклонение не выше 0,5).
- 5.2.8.3. Низкое значение числа копий контрольного гена в образце (для $\beta 2$ микроглобулина менее 10^5 , для *ABL* менее 10^3) свидетельствует о плохом качестве РНК или кДНК, необходимо повторное взятие клинического материала и/или перестановка реакции обратной транскрипции.
- 5.2.8.4. Определение экспрессии гена *BCR-ABL* и экспрессии контрольного гена для данного клинического образца желательно проводить в одной ПЦР реакции, поскольку различия в прохождении двух независимых ПЦР реакций могут внести ошибку в вычисление относительной экспрессии.
- 5.2.8.5. Для корректного проведения реакции ПЦР в реальном времени и вычисления относительной экспрессии гена *BCR-ABL* в клинических образцах, необходимо использовать одинаковое количество тотальной РНК при проведении реакции обратной транскрипции для всех клинических образцов. Рекомендуемое количество тотальной РНК в пересчете на 1 реакцию ПЦР в реальном времени составляет 10-200 нг. Реактивы для выделения тотальной РНК и проведения реакции обратной транскрипции в набор ОНКОСКРИН 1-1-Q не входят.
- 5.2.6.7. Наличие флуоресцентного сигнала (детектируемое значение C_t) в пробах отрицательных контролей свидетельствует о контаминации. Необходимо переставить реакцию ПЦР в реальном времени или реакцию обратной транскрипции и ПЦР в

реальном времени. При этом желательно взять ранее не использованные реактивы и предпринять меры к устранению контаминации.

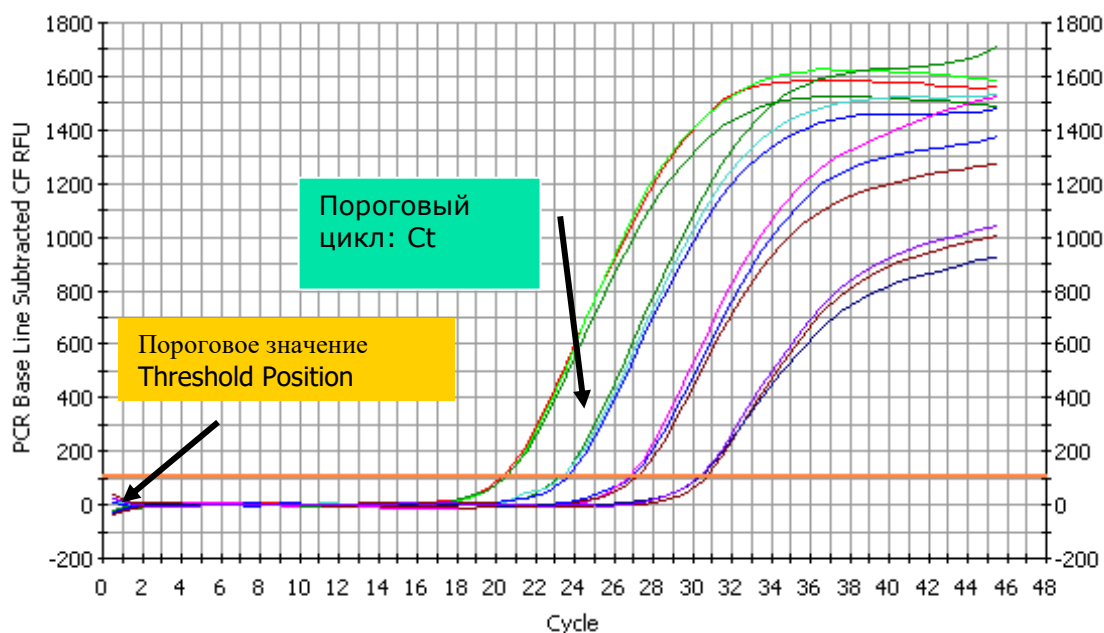


Рис.1 Параметры реакции ПЦР в реальном времени, учитываемые при расчете.

6. ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

- 6.1. Транспортирование диагностического набора следует производить всеми видами крытого транспорта при температуре минус 20°C не более 2-х суток.
- 6.2. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.
- 6.3. Срок годности набора - 12 месяцев со дня приемки набора отделом контроля качества предприятия-изготовителя.
- 6.4. Комплект реактивов для проведения ПЦР в реальном времени должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя, в морозильнике при температуре от минус 18°C до минус 22°C в течение всего срока эксплуатации тест-системы.
- 6.5. Компоненты набора рекомендуется замораживать/размораживать не более 3 раз. Исходя из этого, рекомендуется при первом использовании разделить реактивы на аликвоты, содержащие количество каждого компонента, необходимое для 2-3 реакций, и заморозить.
- 6.6. Положительные контроли желательно хранить при температуре минус 70°C, отдельно от остальных компонентов набора, повторно замораживать/размораживать не более 3 раз, размороженные аликвоты рекомендуется хранить при 4°C (максимальный срок 3 недели).
- 6.7. Пробирку «Зонд BCR-ABL p210 10х» нельзя длительное время подвергать действию прямого света.
- 6.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора ОНКОСКРИН 1-1-Q следует обращаться в ООО «ГеноТехнология» по адресу: 117485, Москва, ул. Профсоюзная, д. 104, тел. (499)530-01-95, (499)502-94-17, (499)530-02-58, e-mail: info@genetechnology.ru.