

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2019 г.

Регистрационный № *022-0319*

**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНА *BCR/ABL1* У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ  
ЛЕЙКОЗОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр  
детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

М.В. Борисевич, к.б.н. Т.В. Савицкая, д.м.н., профессор, член-корреспондент  
НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц  
25.04.2019  
Регистрационный № 022-0319

**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА  
У *BCR/ABL1* ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: М. В. Борисевич, канд. биол. наук Т. В. Савицкая, д-р мед. наук, проф.,  
чл.-кор. НАН Беларуси О. В. Алейникова

Минск 2019

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
дНТФ — дезоксинуклеотидтрифосфат  
ДТТ — дитиотреитол  
ПЦР — полимеразная цепная реакция  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
ABL1 — Abelson leukemia virus gene 1  
BCR — Breakpoint cluster region gene  
MR — minimal residual (минимальный остаток)

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод количественной оценки уровня экспрессии химерного онкогена *BCR/ABL1* у детей с хроническим миелоидным лейкозом с помощью технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ).

Инструкция предназначена для врачей-гематологов, врачей лабораторной диагностики и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с хроническим миелоидным лейкозом в стационарных и амбулаторных условиях.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ ИЗДЕЛИЙ**

1. Термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени.
2. Центрифуга с охлаждением для пробирок объемом 15–50 мл.
3. Мешалка-вортекс.
4. Спектрофотометр.
5. Холодильник (от 2 до 8 °С) с морозильным отделением (-20 °С).
6. Центрифуга с охлаждением (14 000 об/мин).
7. Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1 000 мкл.
8. Оптически прозрачные планшеты и крышки для ПЦР в реальном времени.
9. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1 000 мкл.
10. Стрипы объемом 0,2 мкл.
11. Микропробирки объемами 0,5 и 1,5 мл.
12. Хладоэлемент или охладитель проб.
13. Градиент плотности 1,077 г/мл.
14. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ).
15. Набор реагентов для выделения общей фракции РНК.
16. Набор для синтеза кДНК или обратная транскриптаза.
17. Буфер для обратной транскриптазы.
18. Рэндом-гексамеры.
19. 10 мМ смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ).
20. 0,1 М дитиотреитол (ДТТ).
21. Ингибитор РНКаз (40 ед./мкл).
22. Вода деионизированная.
23. Смесь для ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой.
24. Олигонуклеотиды синтетические (праймеры) и пробы к химерному онкогену *BCR/ABL1* и контрольному гену *ABL1*.
25. Стандартные наборы для определения абсолютного количества копий генов *ABL1* и *BCR/ABL1*.

Материалом для лабораторного исследования служит кровь из периферической вены.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Хронический миелоидный лейкоз у детей.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### ***Выделение мононуклеарных клеток***

Периферическую кровь в объеме 10 мл наслаивают на 0,5 объема градиента плотности 1,077 г/мл, находящегося при комнатной температуре и центрифугируют в течение 30 мин при 400 g. Слой мононуклеарных клеток переносят в чистую пробирку, дважды отмывают в ФСБ (250 g, 10 мин), клетки ресуспендируют в соответствующем объеме буфера.

### ***Выделение суммарной РНК***

Осадок, содержащий  $5-10 \times 10^6$  клеток, лизируют в 1 мл фенолсодержащего реагента для выделения РНК. Лизат оставляют на 5 мин при комнатной температуре для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов, после чего его либо замораживают при (-20 °С), либо используют непосредственно для экстракции РНК. РНК выделяют с использованием фенолсодержащего реагента в соответствии с инструкциями производителя.

Качество и количество РНК оценивают спектрофотометрически. При этом определяют примесь белков по соотношению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм (для нуклеиновых кислот) и 280 нм (для белков) (260/280) и примесь углеводов — по соотношению 260/230 нм. Образец суммарной РНК считают чистым при значении более 1,8.

### ***Обратная транскрипция***

Выделенную из образца РНК используют для синтеза цепей комплементарной ДНК (кДНК) в реакции обратной транскрипции. Для синтеза кДНК подходит любой набор, обеспечивающий эффективный синтез кДНК. Синтез проводят согласно инструкции производителя. Например, 100 нг — 1 мкг тотальной РНК смешивают с 50–250 нг рэндом-гексамеров, 1 мкл 2,5 мМ дНТФ и водой до объема 13 мкл и инкубируют 5 мин при 65 °С. Охлаждают на льду не менее 1 мин, осаждают конденсат со стенок и добавляют остальные реагенты до конечного объема 20 мкл: 4 мкл 5x буфера, 1 мкл 0,1 М ДТТ, 1 мкл ингибитора РНКаз (40 ед./мкл), 1 мкл обратной транскриптазы (200 ед./мкл). Инкубируют последовательно при комнатной температуре 5 мин, при 50 °С в течение 30–60 мин, при 70 °С в течение 15 мин. Помещают образец на 4 °С. В полученную кДНК добавляют 30 мкл воды, кДНК используют непосредственно в ПЦР или замораживают при (-20 °С).

### ***Определение уровня экспрессии химерного онкогена BCR/ABL1 в количественной ПЦР***

Экспрессию онкогена *BCR/ABL1* изучают с использованием кДНК пациентов методом ПЦР в реальном времени с помощью TaqMan зондов. Онкоген *BCR/ABL1* при ХМЛ экспрессируется в виде транскрипта мРНК — Mbcr с

белковыми продуктами p210; ниже представлены последовательности праймеров к этому транскрипту онкогена, а также контрольному гену *ABL1* (таблица).

Таблица — Последовательности олигонуклеотидов (праймеров и зондов)

Ген	Название праймера/пробы	5–3 последовательность
<i>ABL1</i>	ENF1003	TGGAGATAACAСТСТАAGCATAACTAAAGGT
	ENPr1043 (проба)	Fam-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-BHQ1
	ENR1063	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
<i>BCR/ABL1</i>	ENF501 BCR	TCCGCTGACCATCAAYAAGGA
	ENP541 ABL (проба)	Fam-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-BHQ1
	ENR561 ABL	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA

Для определения абсолютного количества копий генов *BCR/ABL1* и контрольного гена *ABL1* предусмотрены стандартные наборы. Для гена *BCR/ABL1* диапазон стандартов включает следующие концентрации:  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  копий гена. Диапазон стандартов для *ABL1* включает следующие концентрации:  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  копий гена. На основе разведений этих генов с помощью программного обеспечения строятся калибровочные кривые.

Готовят реакционную смесь на основе любого стандартного набора для ПЦР в реальном времени с TaqMan пробами согласно инструкции производителя с 300 нМ праймеров, 200 нМ пробы и 5 мкл кДНК или стандартов. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Обязательна постановка отрицательных контролей. Все образцы, включая стандарты, исследуют в дублях. Для каждого образца изучают экспрессию генов *BCR/ABL1* и *ABL1* в разных лунках.

Аmplификацию осуществляют с использованием прибора и программного обеспечения для ПЦР в реальном времени. Реакционную смесь инкубируют 2 мин при 50 °С, 10 мин при 95 °С, затем производят 50 циклов ПЦР (95 °С — 15 с, 60 °С — 60 с). Считывание флуоресценции производят на этапе элонгации.

#### **Оценка качества ПЦР**

В результате ПЦР получают несколько типов данных: о цикле, на котором кривая амплификации пересекает пороговый уровень (threshold), так называемый пороговый цикл  $C_t$ , а также данные о количестве копий генов *BCR/ABL1* и *ABL1* в изучаемых образцах. Порог  $C_t$  устанавливается в первой половине экспоненциальной фазы — выше фоновой флуоресценции.

Используя калибровочные кривые, перед началом анализа необходимо убедиться в том, что параметры ПЦР позволяют получить качественные результаты — эффективность реакции должна быть 100 % (95–105 %), тангенс угла наклона кривой -3,32, коэффициент корреляции  $R = 0,995–1,005$ .

Данные показатели указывают, насколько реальная амплификация продукта соответствует математической модели экспоненциальной фазы, в которой количество молекул ДНК должно удваиваться с каждым циклом реакции.

В случае соответствия калибровочной кривой заданным параметрам оценивают разброс параметров  $C_t$  для контрольного и исследуемого гена, который в идеале не должен превышать 0,5 цикла. Экспрессия контрольного гена *ABL1* должна составлять не менее 10 000 копий гена, в  $C_t$  это не более 26–29 циклов.

### **Количественная оценка уровня экспрессии гена *BCR/ABL1***

Так как контрольный ген *ABL1* экспрессируется на одном уровне во всех образцах, то различные значения его экспрессии отражают разницу в количестве загруженной кДНК в реакцию. Поэтому нормализуют значения экспрессии гена *BCR/ABL1* делением на значение экспрессии контрольного гена *ABL1* (формула):

$$BCR/ABL1_n = BCR-ABL1_x / ABL1_x.$$

где  $BCR/ABL1_n$  — нормализованное значение экспрессии исследуемого гена;

$BCR-ABL1_x$  — ненормализованное значение экспрессии исследуемого гена;

$ABL1_x$  — значение экспрессии контрольного гена.

Полученное значение нормализованной экспрессии  $BCR/ABL1_n$  на момент диагностики принимают за 100 % и в дальнейшем с ним сопоставляют все последующие точки, выражая уровень экспрессии *BCR/ABL1* в % от диагноза. Изменение уровня *BCR/ABL1* можно также выражать в логарифмах (log), когда 1 log соответствует изменению в 10 раз.

Для количественной клинико-лабораторной интерпретации результатов используют следующие критерии:

1. Количество копий *ABL1* в лунках в сумме должно быть не менее 20 000 копий.

2. Положительным считают образец с сигналом меньше  $C_t$  Intercept (значение  $C_t$  1 копии гена) + 1. Образцы с большим значением  $C_t$  рассматриваются как отрицательные.

3. Отрицательный образец с количеством копий *ABL1* (в сумме из двух лунок) 10 000–31 999 рассматривают как отрицательный образец с чувствительностью  $MR^4$  ( $BCR/ABL1 \leq 0,01$  % или  $\geq 4$  log).

4. Отрицательный образец с количеством копий *ABL1* (в сумме из двух лунок) 32 000–99 999, рассматривают как отрицательный образец с чувствительностью  $MR^{4,5}$  ( $BCR/ABL1 \leq 0,0032$  % или  $\geq 4,5$  log).

5. Отрицательный образец с количеством копий *ABL1* (в сумме из двух лунок) равно и более 100 000 рассматривают как отрицательный образец с чувствительностью MR<sup>5</sup> ( $BCR/ABL1 \leq 0,001\%$  или  $\geq 5 \log$ ).

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При проведении метода есть вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Отрицательный образец с низким качеством кДНК (менее 20 000 копий *ABL1* в сумме из двух лунок) не учитывают по причине его низкого качества. Рекомендуется снова выделить РНК, синтезировать кДНК и повторить ПЦР. Положительный образец с низким качеством кДНК (менее 20 000 копий *ABL1* в сумме из двух лунок) и амплификацией химерного гена *BCR/ABL1* свидетельствует о том, что экспрессия гена в образце присутствует, но количественно интерпретировать данные не представляется возможным. Результат выдается только качественный.