

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

\_\_\_\_\_ 2019 г.

Регистрационный №

**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНА *ESK/AEB1* 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

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод количественной оценки уровня экспрессии химерного онкогена *ЕСК/АЕЫ* у детей с хроническим миелоидным лейкозом с использованием 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.

#### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Хронический миелоидный лейкоз у детей

#### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Отсутствуют

## СПИСОК СОКРАЩЕНИИ

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота  
дНТФ - дезоксинуклеотидтрифосфат  
ДТТ - дитиотреитол  
ПЦР - полимеразная цепная реакция  
РНК - рибонуклеиновая кислота  
ЛБЫ - Лейвоп лейкоша ушлв депе 1  
БСК - Бгакропн сн8лег гедюп депе  
МК - шпншал гевлѐиал (минимальный остаток)

## ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИИ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени;  
центрифуга с охлаждением для пробирок объемом 15-50 мл;  
мешалка - вортекс;  
спектрофотометр;  
холодильник (от 2 до 8<sup>0</sup>С) с морозильным отделением (- 20<sup>0</sup>С);  
центрифуга с охлаждением (14000 оборотов/мин);  
дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл;  
оптически прозрачные планшеты и крышки для ПЦР в реальном времени;  
одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл;  
стрипы объемом 0,2 мкл;  
микропробирки объемами 0,5 мл и 1,5 мл;  
хладоэлемент или охладитель проб;

градиент плотности 1,077 г/мл;  
фосфатно-солевой буфер;  
набор реагентов для выделения общей фракции РНК;  
набор для синтеза кДНК или обратная транскриптаза;  
буфер для обратной транскриптазы;  
рэндом гексамеры;  
10мМ смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ);  
0,1 М дитиотреитол (ДТТ);  
ингибитор РНКаз (40 единиц/мкл);  
вода деионизированная;  
смесь для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой;  
олигонуклеотиды синтетические (праймеры) и пробы к химерному онкогену *ЕСК/АЕЫ* и контрольному гену *АЕЫ*;  
стандартные наборы для определения абсолютного количества копий генов *АЕЫ* и *ЕСК/АЕЫ*.  
Материалом для лабораторного исследования служит кровь из периферической вены.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### ***Выделение моноклеарных 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 минут при 400 д. Слой моноклеарных клеток переносят в чистую пробирку, дважды отмывают в фосфатно-солевом буфере (250 д, 10 минут), клетки ресуспендируют в соответствующем объеме буфера.

### ***Выделение суммарной РНК***

Осадок, содержащий  $5-10 \times 10^6$  клеток, лизируют в 1 мл фенол-содержащего реагента для выделения РНК. Лизат оставляют на 5 минут при комнатной температуре для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов, после чего его либо замораживают при ( $-20^0\text{C}$ ), либо используют непосредственно для экстракции РНК. РНК выделяют с использованием фенол-содержащего реагента для выделения РНК в соответствии с инструкциями производителя.

Качество и количество РНК оценивают спектрофотометрически. При этом оценивают 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 показателей 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 минут при  $65^0\text{C}$ . Охлаждают на льду не менее минуты, 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 единиц/мкл), 1 мкл обратной транскриптазы (200 единиц/мкл). Инкубируют последовательно при комнатной температуре 5 минут, при  $50^0\text{C}$  в течение 30-60 минут, при  $70^0\text{C}$  в течение 15 минут. Помещают образец на  $4^0\text{C}$ . В полученную кДНК добавляют 30 мкл воды, кДНК используют непосредственно в ПЦР или замораживают при ( $-20^0\text{C}$ ).

**Определение уровня экспрессии химерного онкогена *ЕСК/ЛЕБ1* в количественной ПЦР**

Исследование экспрессии онкогена *ЕСК/АЕБ1* проводят с использованием кДНК пациентов методом ПЦР в реальном времени с использованием ТадМап зондов. Так как онкоген *ЕСК/АЕБ1* при ХМЛ экспрессируется в виде транскрипта мРНК - МЬсг с белковыми продуктами р210, в таблице 1 представлены последовательности праймеров к этому транскрипту онкогена, а также к контрольному гену *АЕБ1*.

Таблица 1 - Последовательности олигонуклеотидов (праймеров и зондов)

Ген	Название праймера/пробы	5 - 3 последовательность
<i>АЕБ1</i>	ЕМР1003	ТООАОАТААСАСТСТААОСАТААСТАААООТ
	ЕН№>г1043 (проба)	Раш-ССАТТТТТООТТТОООСТТСАСАССАТТ - БН01
	ЕМКЛ063	ОАТОТАОТТОСТТОООАСССА
<i>ЕСК/АЕБ1</i>	ЕМР501 БСК	ТССОСТОАССАТСААУААООА
	ЕН№>541 АБЬ (проба)	Раш-СССТТСАОСОССАОТАОСАТСТОА- БВД1
	ЕЖ561 АБЬ	САСТСАОАСССТОАООСТСАА

Для определения абсолютного количества копий генов *ЕСК/АЕБ1* и контрольного гена *АЕБ1* предусмотрены стандартные наборы. Для гена *ЕСК/АЕБ1* диапазон стандартов включает следующие концентрации:  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  копий гена. Диапазон стандартов для *АЕБ1* включает следующие концентрации:  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  копий гена. На основе разведений этих генов с помощью программного обеспечения строятся калибровочные кривые.

Для проведения реакции готовят реакционную смесь на основе любого стандартного набора для проведения ПЦР в реальном времени с ТадМап 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 исследуют экспрессию генов *ЕСК/АЕЫ* и *АЕЫ* в разных лунках.

Аmplификацию проводят с использованием прибора и программного обеспечения для ПЦР в реальном времени. Реакционную смесь инкубируют 2 минуты при 50<sup>0</sup>С, 10 минут при 95<sup>0</sup>С, затем проводят 50 циклов ПЦР (95<sup>0</sup>С - 15 секунд, 60<sup>0</sup>С - 60 секунд). Считывание флуоресценции проводят на этапе элонгации.

### ***Оценка качества ПЦР***

В результате проведения ПЦР получают несколько типов данных: данные о цикле, на котором кривая амплификации пересекает пороговый уровень (1пге8полс1), так называемый пороговый цикл С1, а также данные о количестве копий генов *ЕСК/АЕЫ* и *АЕЫ* в изучаемых образцах. Порог С устанавливается в первой половине экспоненциальной фазы и 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 составлять -3,32, коэффициент корреляции- 11=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 С для контрольного и исследуемого гена, который в идеале не должен превышать 0,5 цикла.

Экспрессия контрольного гена *АЕЫ* должна составить не менее 10 000 копий гена, в С это составляет не более 26-29 циклов.

### ***Количественная оценка уровня экспрессии гена БСК/АБЫ***

Так как контрольный ген *АЕЫ* 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 *ЕСК/АЕЫ* делением на значение экспрессии контрольного гена *АЕЫ*:

$$ЕСК/АЕЫ_n = ЕСК-АЕЫ_x/АЕЫ_x,$$

где *ЕСК/АЕЫ<sub>n</sub>* - нормализованное значение экспрессии исследуемого гена; *ЕСК-АЕЫ<sub>x</sub>* - ненормализованное значение экспрессии исследуемого гена; *АЕЫ<sub>x</sub>* - значение экспрессии контрольного гена.

Полученное значение нормализованной экспрессии *ЕСК/АЕЫ<sub>n</sub>* на момент постановки диагноза принимают за 100% и в дальнейшем с ним сопоставляют все последующие точки, выражая уровень экспрессии *ЕСК/АЕЫ* в процентах (%) от диагноза. Изменение уровня *ЕСК/АЕЫ* 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 *АЕЫ* в лунках в сумме должно быть не менее 20 000 копий.

2. Положительным считают образец с сигналом меньше  $C_{1\text{пегерl}}$  (значение  $C + 1$  копии гена) +1. Образцы с большим значением  $C$  рассматриваются как отрицательные.



3. Отрицательный образец, с количеством копий *ЛБЫ* (в сумме из двух лунок) - 10 000-31 999, рассматривают как отрицательный образец с чувствительностью  $МК^4$  ( $БСК/ЛБИ < 0,01\%$  или  $> 4$  год).

4. Отрицательный образец, с количеством копий *ЛБЫ* (в сумме из двух лунок) - 32 000-99 999, рассматривают как отрицательный образец с чувствительностью  $МК^{4,5}$  ( $БСК/ЛБЫ < 0,0032\%$  или  $> 4,5$  год).

5. Отрицательный образец, с количеством копий *ЛБЫ* (в сумме из двух лунок) - равно и более 100 000, рассматривают как отрицательный образец с чувствительностью  $МК^5$  ( $БСК/ЛБЫ < 0,001\%$  или  $> 5$  год).

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

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

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич



2019 г.

Регистрационный № 022-0319

**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНА *ВСЯ/АВЫ* 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  
ПАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск, 2019