

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л. Богдан

2026 г.

Регистрационный № 060-1125



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕДКИХ ХИМЕРНЫХ ОНКОГЕНОВ У  
ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

инструкция по применению

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

**АВТОРЫ:** Пахомова И.В., Волочник Е.В., Романцова А.С., Капуза Д.Р., к.б.н.,  
доцент Белевцев М.В.

Минск, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения химерных онкогенов  $t(5;11)(q35;p15.5) / NUP98::NSD1$ ,  $t(11;12)(p15;p13) / NUP98::KDM5A$  (и других редких вариантов aberrаций гена *NUP98*, включая  $t(X;11)(q28;p15) / NUP98::HMGB3$ ),  $inv(16)(p13.3q24.3) / CBFA2T3::GLIS2$ ,  $t(16;21)(p11;q22) / FUS::ERG$ ,  $t(7;12)(q36;p13) / MNX1::ETV6$  (*HLXB9::MVX*) и  $inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26) / GATA2;MECOM$  (*RPNI::MECOM*), применимый в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение острого миелоидного лейкоза (С92).

Метод, изложенный в настоящей инструкции предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-гематологов и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с острыми лейкозами.

**1. Показания к применению:** острый миелоидный лейкоз (С92).

**2. Противопоказания:** нет.

**3. Список сокращений:**

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота;

КМ – костный мозг;

МНК – моноклеарные клетки;

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз;

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*;

GTG – цитогенетическая техника дифференциального окрашивания хромосом для анализа кариотипа (от англ. G-bands by trypsin using Giemsa).

**4. Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и расходных материалов:**

ламинарный шкаф;

вытяжной шкаф;

штативы для пробирок различного объема;

охлаждающий штатив для пробирок объемом от 0,2 до 2 мкл;

водяная баня;

гибридизатор;

инкубатор с 5% CO<sub>2</sub>;

световой микроскоп лабораторного класса с объективами ×20/40/60;

флуоресцентный микроскоп (общее увеличение минимум ×1000; объективы классом не ниже планахромат ×10/×40/×100 (масляная иммерсия);

центрифуга с охлаждением для пробирок объемом 15 мл;

микроцентрифуга с охлаждением для пробирок типа эппендорф;

вихревой смеситель (вортекс);

спектрофотометр;

термоциклер;

оборудование для горизонтального электрофореза;

оборудование для капиллярного секвенирования;

фиколл-урографин с удельной плотностью  $\rho = 1,077$  г/мл;

питательная среда для культивирования моноклеарных клеток;

эмбриональная телячья сыворотка;

L-глутамин;

инсулин-трансферрин-селен;

раствор колцемида в концентрации 10 мг/мл;

ледяная уксусная кислота 100%;

метанол (>99,99%);

этанол, 96%;

буфер для лизиса эритроцитов;

трис-боратный, фосфатно-боратный, цитратно-солевой буфер;

соли KCl, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

краситель Гимза;

ДНК-зонды на разрыв генов *NUP98* и *ETV6*;

ДНК-зонды для транслокаций *CBFA2T3::GLIS2*, *FUS::ERG*, *GATA2;MECOM* и *MNX1::ETV6*;

иммерсионное масло свободное от флуоресценции;

реагент/набор для выделения РНК;

набор реагентов для проведения обратной транскрипции;

набор реагентов для ПЦР, включающий ДНК полимеразу;  
набор реагентов для капиллярного секвенирования;  
праймеры для амплификации *NUP98::NSD1*, *NUP98::KDM5A*,  
*NUP98::HMGB3*, *CBFA2T3::GLIS2*, *FUS::ERG*, *MNX1::ETV6*;  
хлороформ;  
изопропанол;  
формаид;  
маркер молекулярного веса от 100 пар оснований до 1000 пар оснований;  
деионизированная вода;  
стеклянные ёмкости Хеллендаля и Коплина;  
пробирки с антикоагулянтом К<sub>2</sub>ЭДТА;  
стерильные градуированные пробирки объемом 15 мл с крышкой;  
круглодонные пробирки 12 мл для культивирования, с крышкой;  
стеклянные пробирки 10 мл с круглым дном;  
стерильные культуральные флаконы объемом 50 мл и площадью дна  
25 см<sup>2</sup>;  
дозатор и стерильные серологические пипетки объемом 5 и 10 мл;  
стерильные пастеровские пипетки;  
камера Горяева и покровные стекла для камеры Горяева;  
предметные стекла 76x26 мм;  
покровные стекла 18x18 и 22x22 мм;  
дозаторы автоматические с переменным объемом;  
одноразовые наконечники с аэрозольным барьером;  
пробирки типа эппендорф объемом 0,2, 0,5, 1,5 и 2 мл;  
96-луночный планшет для капиллярного секвенирования.

#### **4. Описание технологии использования метода**

Метод включает следующие этапы:

##### **1. Получение биологического материала**

В качестве биологического материала используют образец костного мозга (КМ) на момент постановки диагноза объемом не менее 3 мл. Взятие

образца КМ происходит общепринятыми методами с использованием пробирок с антикоагулянтом К<sub>2</sub>ЭДТА.

## **2. Пробоподготовка**

### *2.1 Выделение моноклеарных клеток.*

Выделение моноклеарных клеток (МНК) КМ осуществляют, соблюдая условия стерильности, с использованием фиколл-урографина с удельной плотностью  $\rho = 1,077$  г/мл согласно инструкции производителя. Для отмывки и разведения осадка МНК используют 0,9% раствор NaCl с 3% эмбриональной телячьей сывороткой для цитогенетических исследований или фосфатно-солевого буфера – для молекулярно-генетических исследований. Подсчет концентрации МНК проводили в камере Горяева после фиксации 3% уксусной кислотой.

### *2.2 Приготовление культуры моноклеарных клеток.*

В предварительно нагретую питательную среду добавить МНК в концентрации  $1,5 \times 10^6$  на 1 мл среды (при наличии достаточного количества МНК ставится несколько вариантов культур МНК на одного пациента:

- 1) только полная питательная среда;
- 2) полная питательная среда с добавлением 100X инсулин-трансферрин-селена;
- 3) полная питательная среда с добавлением L-глутамина.

Приготовленные культуры МНК перемешать легким покачиванием и поместить в инкубатор с 5% CO<sub>2</sub> на ночь.

### *2.3 Фиксация культуры моноклеарных клеток.*

МНК после культивирования обрабатывают раствором колцемида в концентрации 10 мг/мл с последующей обработкой раствором 0,55% KCl. Фиксация проводится свежим раствором Карнуа (метанол:уксусная кислота, 3:1) с заключительной выдержкой при +4°C не менее 2 суток.

### *2.4 Приготовление цитогенетических препаратов.*

Фиксированные МНК центрифугируют и ресуспендируют в свежеприготовленном растворе Карнуа. Для проведения кариотипирования

методом GTG проводят раскапывание фиксированной культуры МНК не менее чем на 8 предметных стекол с высоты 15–20 см над водяной баней (+60...+65°C), а для FISH – на одно стекло для каждого ДНК-зонда с малой высоты. Полученные препараты выдерживают при комнатной температуре в течении 2–3 суток или +56°C в течении 1–2 часов.

### 3. Определение кариотипа методом GTG

Для одного цитогенетического препарата проводят пробное окрашивание с использованием 0,25% раствора трипсина (5,5 секунд) и 4% раствора красителя Гимза (4 минуты). Оценка качества окрашивания осуществляется под световым микроскопом при общем увеличении  $\times 1000$  с применением масляной иммерсии. При удовлетворительном результате GTG окрашивания (визуализируется не менее 300-350 бэндов на гаплоидный набор хромосом) обработка остальных цитогенетических препаратов проводится при тех же условиях. При плохом качестве окрашивания время обработки цитогенетического препарата в растворах трипсина и красителя Гимза подбирают индивидуально. Интерпретацию хромосомных нарушений и запись кариотипа проводят согласно Международной цитогеномной номенклатуре человека (ISCN) (2020 год).

### 4. FISH

Для выявления перестроек гена *NUP98* и  $t(7;12)(q36;p13) / MNX1::ETV6$  используются ДНК-зонды на разрыв генов *NUP98* и *ETV6*, согласно инструкции производителя. Для идентификации химерных онкогенов *CBFA2T3::GLIS2*, *FUS::ERG*, *GATA2;MECOM* и *MNX1::ETV6* используются ДНК-зонды на выявление химерных (слитых) онкогенов, согласно инструкции производителя. Анализ проводится минимум двумя врачами лабораторной диагностики, специализирующимися на цитогенетических методах исследования.

Для исследования анализируют 200 интерфазных ядер, соответствующих критериям качества: изолированное расположение, отсутствие сегментации ядра, равномерная окраска нуклеуса раствором DAPI, четкие границы и яркие

не диффузные сигналы. Запись и интерпретация результатов производится согласно ISCN.

## 5. Определение экспрессии химерных онкогенов *NUP98::NSD1*, *NUP98::KDM5A*, *NUP98::HMGB3*, *CBFA2T3::GLIS2*, *FUS::ERG*, *MNX1::ETV6* методом ОТ-ПЦР

### 5.1 Выделение РНК и синтез кДНК

Выделение РНК из МНК осуществляется методом фенол-хлороформной экстракции либо с использованием наборов реагентов, предназначенных для экстракции РНК согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводится с использованием набора реагентов для обратной транскрипции согласно инструкции производителя.

### 5.2 Проведение ПЦР анализируемых химерных онкогенов

Аmplификация химерных онкогенов *FUS::ERG*, *MNX1::ETV6* проводится методом гнездовой ПЦР. Для приготовления реакционной смеси используется набор реагентов для проведения ПЦР согласно инструкции производителя и специфические праймеры в концентрации 20 пмоль/реакцию. Последовательности праймеров для амплификации химерных онкогенов *NUP98::KDM5A*, *NUP98::HMGB3*, *CBFA2T3::GLIS2* представлены в таблице 1, для первого и второго шага гнездовой ПЦР химерных онкогенов *FUS::ERG*, *MNX1::ETV6* – в таблицах 2 и 3, соответственно.

Таблица 1 – Последовательность праймеров для амплификации химерных онкогенов *NUP98::NSD1*, *NUP98::KDM5A*, *NUP98::HMGB3*, *CBFA2T3::GLIS2*

Название химерного онкогена	Название праймера	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C
<i>NUP98::NSD1</i>	N98-NSD_F	TCTTGGTACAGGAGCCTTTG	63
	N98-NSD_R	TCCAAAAGCCACTTGCTTGGC	
<i>NUP98::KDM5A</i>	N- KDM5A_F	TGGACAGGCATCTTTGTT	60
	N- KDM5A_R	TCAGCTCCTTTGATTTGTCT	
<i>NUP98::HMGB3</i>	NUP98_F	TTGGCCAACAGAATCAGCAGAC	63
	HMGB3_R	CCGGGCAACTTTAGCAGGAC	
<i>CBFA2T3::GLIS2</i>	CBF-GLI_F	GACGCCGAGGACACAAAGAA	60
	CBF-GLI_R	TGGGAGGGGTAAGGAAGGAG	

Таблица 2 – Последовательность праймеров для первого этапа амплификации химерных онкогенов *HLXB9::MVX* и *FUS::ERG*

Название химерного онкогена	Название праймера	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C
<i>HLXB9::MVX</i>	M-ETV6_1F	CTTCCAGCTGGACCAGTGGCTG	58
	M-ETV6_1R	CTGAAGGAGTTCATAGAGCACATC	
<i>FUS::ERG</i>	FUS-ERG_1F	CTATGGACAGCAGGACCGTG	61
	FUS-ERG_1R	TGTTGGGTTTGCTCTTCCGCTC	

**Важно!** При проведении ПЦР обязательно постановка контроля эффективности амплификации (положительной контроль) и контроля контаминации (отрицательный контроль).

Таблица 3 – Последовательность праймеров для второго раунда амплификации химерных онкогенов *HLXB9::MVX* и *FUS::ERG*

Название химерного онкогена	Название праймера	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C
<i>HLXB9::MVX</i>	M-ETV6_2F	CACCGCGGGCATGATCCTGC	58
	M-ETV6_2R	ATCGATAGCGAAAGTCCTCTT	
<i>FUS::ERG</i>	FUS-ERG_2F	GGTGGCTATGAACCCAGAGG	61
	FUS-ERG_2R	CGGGATCCGTCATCTTGAACTC	

Амплификация проводится в термоциклере, совместимом с используемыми пробирками типа эппендорф. Температура отжига праймеров для каждого химерного онкогена представлена в таблице 1.

#### 4.4 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

Визуализация результатов ПЦР проводится методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. Интерпретация результатов включает проверку контролей и анализ образцов на наличие специфичных ПЦР-продуктов. Фрагменты геля, содержащие ПЦР продукт вырезаются и переносятся в чистую пробирку типа эппендорф. В пробирку, содержащую фрагмент геля вносят деионизированную воду в количестве 100 мкл и инкубируют при комнатной температуре в течение 12 часов.

#### 4.5 Определение нуклеотидной последовательности методом прямого секвенирования по Сенгеру

На основании полученных ампликонов проводят реакцию терминации с использованием специфических праймеров (таблицы 1-3) и набора реагентов для секвенирования согласно инструкции производителя. Реакционную смесь очищают методом спиртовой преципитацией, денатурируют в растворе формамида и анализируют на капиллярном секвенаторе. Анализ полученных результатов проводится с использованием доступных биоинформационных программ.

Алгоритм использования описанных этапов анализа для хромосомных перестроек  $t(5;11)(q35;p15.5) / NUP98::NSD1$ ,  $t(11;12)(p15;p13) / NUP98::KDM5A$  (и других редких вариантов aberrаций гена *NUP98*, включая  $t(X;11)(q28;p15) / NUP98::HMGB3$ ),  $inv(16)(p13.3q24.3) / CBFA2T3::GLIS2$ ,  $t(16;21)(p11;q22) / FUS::ERG$ ,  $t(7;12)(q36;p13) / MNX1::ETV6$  и  $inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26) / GATA2;MECOM$ ) представлен в приложении А настоящей инструкции.

### 6. Принятие управленческого решения

При обнаружении одной и более редких хромосомных перестроек  $t(5;11)(q35;p15.5) / NUP98::NSD1$ ,  $t(11;12)(p15;p13) / NUP98::KDM5A$  (и других редкие перестройки гена *NUP98*, включая  $t(X;11)(q28;p15) / NUP98::HMGB3$ ),  $inv(16)(p13.3q24.3) / CBFA2T3::GLIS2$ ,  $t(16;21)(p11;q22) / FUS::ERG$ ,  $t(7;12)(q36;p13) / MNX1::ETV6$  и  $inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26) / GATA2;MECOM$ ) у пациентов с ОМЛ, осуществляют мероприятия в соответствии с пунктом 25.5.5 главы 4 клинического протокола «Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями», утвержденного постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.12.2022 № 113.

### ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА

1. Отсутствие / слабые или диффузные сигналы в нуклеусах при выполнении FISH.

Устранение: соблюдать технологию фиксации, использовать свежеприготовленные растворы для пре- и постгибридизационной обработки, подбор концентрации отмывочных растворов, подбор температуры денатурации и гибридизации.

2. Ложноположительный ответ при выполнении FISH.

Устранение: определение погрешностей для новых ДНК-зондов, постановка контролей для новых партий ДНК-проб, двойное независимое цитогенетическое исследование с привлечением не менее двух специалистов в области цитогенетических исследований.

3. Отсутствие или слабая амплификация при проведении ОТ-ПЦР.

Устранение: повторить анализ, уделяя особое внимание условиям хранения реагентов и качеству биологического материала.

4. Контаминация реагентов при проведении ОТ-ПЦР (наличие ПЦР продукта в реакционной смеси отрицательного контроля).

Устранение: использование одноразовых расходных материалов и смена наконечников для дозаторов после каждого реагента и образца биологического материала.

## Приложение А

Алгоритм определения хромосомных перестроек *NUP98::NSD1*, *NUP98::KDM5A* (и других редких вариантов aberrаций гена *NUP98*), *CBFA2T3::GLIS2*, *FUS::ERG*, *MNX1::ETV6* и *GATA2::MECOM*

