



## ЭпиГенТест-MGMT

Набор реагентов  
для детекции aberrантного метилирования  
промоторной области гена человека *MGMT*

Номер по каталогу  
EGS01

Инструкция по применению

## Оглавление

1. Назначение .....	3
2. Приборы ПЦР-РВ.....	3
3. Состав набора.....	3
4. Краткая информация об исследуемом гене .....	6
5. Исследуемые регионы генома .....	6
6. Принцип действия набора .....	7
7. Аналитические характеристики набора.....	10
8. Условия транспортировки, хранения и использования.....	10
9. Меры предосторожности.....	11
10. Биологический материал для анализа .....	12
11. Необходимые материалы и оборудование, не входящие в комплект поставки.....	13
12. Проведение исследования .....	14
13. Протокол.....	15
14. Анализ результатов .....	21
15. Возможные проблемы .....	26
16. Приложения.....	29
Графические символы .....	35

## 1. Назначение

**ТОЛЬКО ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ.  
НЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ ИЛИ ВЕТЕРИНАРИИ.**

Набор реагентов «ЭпиГенТест-MGMT» предназначен для качественного определения статуса метилирования промоторной области гена *MGMT* (*O*-6-*MethylGuanine-DNA MethylTransferase*) методом метилспецифической ПЦР в режиме реального времени.

Исследуемый материал – препарат геномной ДНК человека опухолевого происхождения.

Для исследования можно использовать фрагментированную ДНК с размером фрагментов 150-200 п.о.

Количество исследуемых образцов от 10 до 28.

Избирательность метода 1:10, т.е. выявится от 10% ДНК с aberrантным метилированием на фоне неметилированной ДНК. Аналитическая чувствительность - от 1 нг метилированной геномной ДНК (~290 копий).

Рекомендуемое количество ДНК: 100-500 нг на одну реакцию бисульфитной обработки.

## 2. Приборы ПЦР-РВ

- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad);
- Applied Biosystems® 7500 и StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher);
- Rotor-Gene Q (Qiagen).

Регистрация сигнала производится по детектирующему каналу FAM (Green). Использование других приборов может потребовать изменения параметров ПЦР и повлиять на чувствительность и специфичность метода.

## 3. Состав набора

Набор реагентов «ЭпиГенТест MGMT» включает два модуля:

- 1) Модуль для бисульфитной обработки ДНК с последующей очисткой на колонках, **кат. № EG011**.
- 2) Модуль для амплификации фрагментов генов *MGMT* и *ACTB* после бисульфитной обработки ДНК, **кат. № EG101**.

Кат. № Название набора	Кат. № Модули в составе набора	Кол-во реакций	Кол-во исследуемых образцов
<b>EGS01</b> Набор реагентов «ЭпиГенТест-MGMT» для детекции аберрантного метилования промоторной области гена <i>MGMT</i>	<b>EG011</b> Модуль для бисульфитной обработки ДНК с последующей очисткой на колонках	30	10-28
	<b>EG101</b> Модуль для амплификации фрагментов генов <i>MGMT</i> и <i>ACTB</i> после бисульфитной обработки ДНК	100	

**EG011 Модуль для бисульфитной обработки ДНК с последующей очисткой на колонках** включает следующие реагенты:

Название компонента	Объем реагента в пробирке/ флаконе	Количество
<b>Модифицирующий реагент</b>	1.3 мл	3 пробирки
<b>Связывающий буфер</b>	18 мл	1 флакон
<b>Промывочный буфер (концентрат)*</b>	3 мл	1 флакон
<b>Десульфонирующий буфер</b>	1.5 мл	4 пробирки
<b>Элюирующий буфер</b>	1.5 мл	1 пробирка
<b>Колонки с крышками</b>		30 штук
<b>Собираательные пробирки 2 мл без крышек</b>		60 штук
<b>Микроцентрифужные пробирки 1.5 мл с крышками</b>		30 штук

\* Перед началом работы добавьте к буферу 13 мл 96% этанола.

**Модифицирующий реагент ЭпиГенТест** превращает остатки цитозина в остатки урацила, которые ДНК-полимераза воспринимает как тимины; при этом модифицированные остатки 5-метилцитозина не изменяются.

**EG101 Модуль для амплификации фрагментов генов *MGMT* и *ACTB* после бисульфитной обработки ДНК** включает следующие реагенты:

Название компонента	Объем реагента в пробирке	Количество пробирок
<b>5X ЭпиГенТест ПЦР-смесь</b>	0.5 мл	2
<b>Реагент ЭпиГенТест-MGMT</b>	1.5 мл	1
<b>Реагент ЭпиГенТест-ACTB</b>	1.5 мл	1
<b>ПКО ЭпиГенТест-MGMT</b>	0.2 мл	1
<b>ОКО ЭпиГенТест-MGMT</b>	0.2 мл	1

**5X ЭпиГенТест ПЦР-смесь** содержит все необходимые компоненты для ПЦР (реакционный буфер с ионами  $Mg^{2+}$ , нуклеотидтрифосфаты, высоко-процессивную Taq-полимеразу с «горячим стартом», обеспеченным специфическими моноклональными антителами).

**Реагент ЭпиГенТест-MGMT** содержит олигонуклеотидные праймеры и детектирующие зонды, специфичные к фрагменту промоторной области гена *MGMT* с aberrантным метилированием (реакция идет только в случае наличия метил-цитозинов, не подвергающихся модификации при бисульфитной обработке, и при корректном прохождении бисульфитной обработки).

**Реагент ЭпиГенТест-ACTB** содержит олигонуклеотидные праймеры и детектирующие зонды, специфичные к фрагменту гена *ACTB* без CpG-островков (реакция идет только в случае корректного прохождения бисульфитной обработки).

**Положительный контрольный образец ДНК (ПКО)** представляет собой смесь двух образцов геномной ДНК человека из клеточных линий – с aberrантным метилированием и без aberrантного метилирования промоторной области гена *MGMT*; относительная концентрация ДНК с aberrантным метилированием промоторной области гена *MGMT* – 10%; суммарная концентрация ДНК в ПКО – 10 нг/мкл.

**Отрицательный контрольный образец ДНК (ОКО)** представляет собой образец геномной ДНК человека без aberrантного метилирования промоторной области гена *MGMT*; конечная концентрация ДНК в ОКО – 10 нг/мкл.

## 4. Краткая информация об исследуемом гене

Ген *MGMT* кодирует Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу – ядерный белок, играющий ключевую роль в репарации повреждений ДНК, вызываемых простыми алкилирующими агентами. Ген *MGMT* является геном-супрессором опухолевого роста. Примерно в 15% случаев злокачественных опухолей человека этот ген инактивируется, преимущественно путем гиперметилирования промоторной области. Большинство этих случаев приходится на злокачественные глиомы, меланому, нейроэндокринные опухоли брюшной полости, колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак пищевода и некоторые гемобласты.

## 5. Исследуемые регионы генома

### Ген *MGMT*

Транскрипт	Координаты исследуемых регионов по HGVS	Альтернативные названия исследуемых регионов	
		По источнику [18]*	По источнику [3]*
<b>NM_002412.4</b>	<b>A:</b> с. 15-16, с. 17-18;	<b>A:</b> +93, +95;	<b>A:</b> 72, 73;
	<b>B:</b> с. 28-29, с. 35-36, с. 40-41, с. 43-44, с. 47-48;	<b>B:</b> +106, +113, +118, +121, +125;	<b>B:</b> 74, 75, 76, 77, 78;
	<b>C:</b> с. 57-58, с. 59-60, с. 64-65, с. 69-70, с. 75-76;	<b>C:</b> +135, +137, +142, +147, +153;	<b>C:</b> 79, 80, 81, 82, 83;
	<b>D:</b> IVS1 +15 – +16, IVS1 +20 – +21, IVS1 +26 – +27	<b>D:</b> +174, +179, +185	<b>D:</b> 84, 85, 86

\* Список литературы в Приложении.

В таблице приведены координаты CpG-динуклеотидов, статус метилирования которых определяется или может быть определен с помощью набора реагентов «ЭпиГенТест *MGMT*».

A – CpG-динуклеотиды, входящие в область прямого праймера.

B – CpG-динуклеотиды, входящие в целевой продукт ПЦР, но не детектируемые с помощью ПЦР-РВ. Могут быть детектированы при секвенировании (см. Замечания по применению набора).

C – CpG-динуклеотиды, входящие в область детектирующего зонда.

D – CpG-динуклеотиды, входящие в область обратного праймера.

## 6. Принцип действия набора

Для детекции aberrантного метилирования ДНК используется метилспецифическая полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени (МС-ПЦР-РВ).

Анализ проводится в два этапа.

**На первом этапе** происходит бисульфитная обработка ДНК.

При бисульфитной обработке ДНК немодифицированные остатки цитозина превращаются в урацил. Метилированный по 5'-положению цитозин не конвертируется в урацил, поскольку 5'-метильная группа является химической защитой и препятствует реакции сульфонирования и дезаминирования в 6'-положении.



Таким образом, после бисульфитной обработки только в области метилированных остатков цитозина сохраняется исходная нуклеотидная последовательность.

**На втором этапе** анализа очищенная после бисульфитной обработки ДНК используется для анализа методом ПЦР. Полимераза воспринимает остатки урацила как тиминовые, а метилцитозина – как остатки цитозина. Иными словами, различие между С и 5mС, не детектируемое напрямую с помощью полимеразных реакций, превращается в различие между Т и С, которое можно однозначно детектировать методом ПЦР.

Анализ проводится методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени с зондами типа Taqman, меченными флуоресцентным красителем FAM. ПЦР проводят для двух фрагментов: гена *MGMT* – для

определения его статуса метилирования – и гена бета-актина (*ACTB*) в качестве контроля (см. рис. 1). Для повышения аналитической чувствительности реакции проводятся в разных пробирках.

Аmplифицируемый фрагмент гена *ACTB* не содержит CpG-динуклеотидов и поэтому *in vivo* никогда не подвергается метилированию. Следовательно, в процессе бисульфитной обработки его нуклеотидная структура всегда изменяется (C → U). Праймеры и зонд в реакции *ACTB* комплементарны к бисульфитно-модифицированной последовательности, поэтому ПЦР будет проходить только в том случае, если этап бисульфитной модификации выполнен успешно.

Аmplификация фрагмента гена *ACTB* необходима для контроля следующих этапов работы:

- качества бисульфитной обработки (если бисульфитная модификация не прошла, то аллель-специфические праймеры к *ACTB* не будут работать в ПЦР, поскольку они комплементарны к модифицированной ДНК);
- наличия в реакционной смеси необходимого количества матричной ДНК (достоверность анализа зависит количества ДНК в ПЦР).

Аллель-специфические праймеры и зонд для амплификации фрагмента гена *MGMT* расположены в области CpG-динуклеотидов, по которым обычно происходит метилирование. Праймеры и зонд в реакции *MGMT* комплементарны последовательности, которая сохраняет исходную структуру в области CpG-динуклеотидов после бисульфитной обработки. Поэтому ПЦР будет проходить только в присутствии метилированной ДНК.

Чтобы убедиться в полной конверсии остатков при бисульфитной обработке, для анализа необходимо использовать контрольные образцы с частично метилированной и неметилированной ДНК. Для этого в параллель с исследуемыми образцами ДНК обязательно нужно проводить бисульфитную обработку двух контрольных образцов: ПКО (смесь ДНК с гиперметилированным и не гиперметилированным промотором *MGMT* в соотношении 1:10) и ОКО (ДНК с не гиперметилированным промотором *MGMT*), а затем использовать эти образцы в качестве контрольных в ПЦР.

Кроме контрольных образцов ОКО и ПКО, в каждую постановку ПЦР всегда необходимо включать контроль без матрицы (NTC), для подтверждения отсутствия контаминации реагентов и рабочего места.



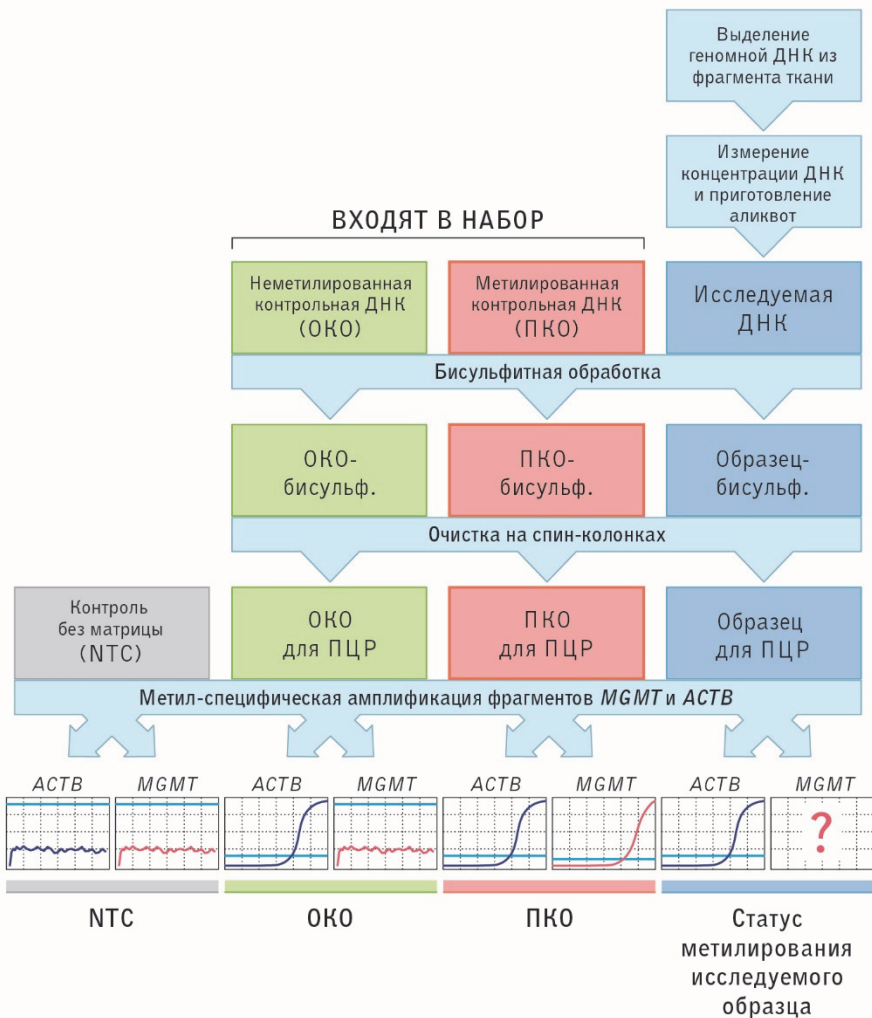


Рисунок 1 – схема проведения анализа.

## 7. Аналитические характеристики набора

### 7.1. Модуль для бисульфитной модификации ДНК

Эффективность конверсии – более 99.5% неметилированных остатков цитозина. Защита метилированных остатков цитозина – более 99.5%. Пригодность ДНК для ПЦР после бисульфитной обработки – более 80%.

Рекомендуемое количество ДНК: 100-500 нг на одну реакцию.

### 7.2. Модуль для амплификации фрагментов генов *MGMT* и *ACTB* после бисульфитной обработки ДНК

#### Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода — от 1 нг метилированной геномной ДНК (~290 копий).

#### Избирательность

Избирательность метода составляет 1:10, т.е. метод позволяет детектировать от 10% копий ДНК с aberrантным метилированием промоторной области гена *MGMT* на фоне неметилированной ДНК.

#### Размер амплифицируемых фрагментов (ампликонов)

Ген	Размер ампликона, п.о.
<i>MGMT</i>	122
<i>ACTB</i>	131

## 8. Условия транспортирования и хранения

### 8.1. Модуль для бисульфитной обработки ДНК

Все компоненты хранятся и перевозятся при комнатной температуре (от +15 до +25°C). Коробку с реагентами хранить в сухом, защищенном от света месте.

### 8.2. Модуль для амплификации фрагментов генов *MGMT* и *ACTB* после бисульфитной обработки ДНК

Все компоненты перевозятся в замороженном состоянии и хранятся при температуре от -25 до -15°C.

При получении набора МОДУЛЬ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ (Кат. № EG101) немедленно поместить в холодильник на -20°C. Избегать воздействия прямого света на компоненты набора.

*Избегать многократного (более 10 раз) размораживания и замораживания реагентов.*

*Контрольные образцы ДНК (ПКО, ОКО) рекомендуется поместить в отдельный холодильник, в котором хранятся исследуемые образцы ДНК.*

Срок годности набора реагентов при соблюдении условий транспортирования и хранения – 12 месяцев с даты изготовления.

## 9. Меры предосторожности

Все компоненты набора, кроме «Модифицирующего реагента», в используемых концентрациях не токсичны.

Не допускать контакта «Модифицирующего реагента» с организмом человека, не вдыхать пары, не проглатывать.

Все компоненты набора хранить в плотно закрытой таре.

Ключевой мерой предосторожности при работе с набором является соблюдение требований «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

Метод ПЦР крайне чувствителен к контаминации. Для предотвращения контаминации, этапы работы необходимо проводить в отдельных помещениях с изолированной системой вентиляции или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами автоматических пипеток, халатами, всеми необходимыми расходными материалами и оборудованием:

- (1) зона для работы с геномной ДНК (для выделения ДНК и подготовки образцов матрицы),
- (2) «чистая» зона, изолированная от источника матрицы (для подготовки ПЦР),
- (3) зона для внесения матрицы ДНК в реакцию смесь,
- (4) зона для манипуляций с ПЦР-продуктом (очистка, подготовка к секвенированию)

При необходимости возможно совмещение рабочей зоны-2 и рабочей зоны-3 в одном помещении при наличии в нем отдельных боксов.

ПЦР-амплификаторы не должны располагаться в зонах 1-3. При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Работать только в одноразовых неопудренных перчатках и в спецодежде.
- Использовать наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов. Для каждой процедуры использовать новый наконечник.
- Приготовление реакционной смеси и выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
- После перемешивания пробирок всегда осаждают капли со стенок на микроцентрифуге, избегать касания внутренней поверхности пробирок и крышек.
- Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
- Уничтожать неиспользованные остатки образцов и реактивов в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».
- Поверхности рабочих столов, ПЦР-боксов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение не менее 30 мин.

## 10. Биологический материал для анализа

В качестве материала для анализа используется геномная ДНК человека, выделенная из опухолевой ткани:

- ткани (свежезамороженные и фиксированные фрагменты тканей, срезы с парафиновых блоков);
- цитологический материал;
- клеточные культуры.

### **ВНИМАНИЕ!**

ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДОСТОВЕРНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ОБРАЗЦОВ ОПУХОЛИ НЕОБХОДИМО ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ПРОВЕСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ (ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ ИЛИ ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ) АНАЛИЗ.

Образцы считаются пригодными для анализа, если они удовлетворяют двум условиям:

- опухоль занимает не менее 80% площади препарата;
- некротизированные клетки и кровь занимают в совокупности не более 15% площади препарата.

В случае, если образец не удовлетворяет хотя бы одному из этих условий, рекомендуется:

Тип материала	Рекомендуемые действия
Материал из парафиновых блоков	Провести ручную диссекцию образца с последующим морфологическим контролем ее результатов или сделать срезы, нанести их на стекла, покрытые поли-L-лизинном, и произвести разметку стеклопрепаратов с обратной стороны, отметив вероятные границы зоны опухоли.
Материал из окрашенных стеклопрепаратов	Сделать разметку с обратной стороны каждого стеклопрепарата, отметив границы зоны опухоли.

Для выделения ДНК использовать только отмеченную область препарата.

Рекомендации по выделению ДНК находятся в разделе 13.1 «Подготовка анализируемых образцов».

## 11. Необходимые материалы и оборудование, не входящие в комплект поставки

### Реагенты

- деионизованная вода для ПЦР;
- этиловый спирт (96%);
- набор реагентов для выделения геномной ДНК (в зависимости от типа биологического материала);
- набор реагентов для оценки концентрации ДНК «КвантумДНК-156» (AS002, НОМОТЕК).

### Приборы

- штативы для планшетов и пробирок;
- термостат;
- встряхиватель для пробирок (вортекс);
- ПЦР-боксы или ламинарные шкафы (для подготовки ПЦР);
- регулируемые дозаторы;
- микроцентрифуга для пробирок;

- центрифуга для планшетов;
- настольная центрифуга для пробирок (от 8000 g);
- термоциклер (амплификатор);
- прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени с детектирующим каналом FAM (Green).

### **Расходные материалы**

- одноразовые неопудренные перчатки;
- наконечники для дозаторов с гидрофобным фильтром;
- микропробирки для центрифугирования объемом 0.5 мл и 1.5 мл;
- оптически прозрачные микропробирки (стрипы или плашки) для RealTime ПЦР;
- оптическая пленка для запечатывания (в случае использования плашки).

## **12. Проведение исследования**

Исследование биологических проб с помощью набора «ЭпиГенТест MGMT» включает в себя следующие этапы (см. рис. 1):

- выделение геномной ДНК;
- оценка концентрации ДНК;
- подготовка рабочих аликвот с концентрацией ДНК 5-25 нг/мкл;
- бисульфитная обработка (Модуль для бисульфитной обработки ДНК с последующей очисткой на колонках);
- очистка обработанных образцов на колонках (Модуль для бисульфитной обработки ДНК с последующей очисткой на колонках);
- проведение ПЦР-РВ (Модуль для амплификации фрагментов генов *MGMT* и *ACTB*);
- анализ результатов.

## 13. Протокол

### 13.1. Подготовка анализируемых образцов

#### 13.1.1. Выделение ДНК

*Работа по выделению геномной ДНК должна выполняться в зоне-1, отделенной от всех последующих этапов работы.*

Выделение геномной ДНК из тканей можно провести любым набором, предназначенным для этой цели.

Для выделения геномной ДНК из парафиновых блоков, срезов или со стеклопрепаратов рекомендуется использовать набор «ЭкстрактДНК FFPE» (BM103, НОМОТЕК).

#### 13.1.2. Оценка концентрации полученной ДНК

Для успешного анализа набором «ЭпиГенТест-MGMT» необходимо оценить **концентрацию ДНК**. Для измерения рекомендуется воспользоваться набором «КвантумДНК-15б» (AS002, НОМОТЕК) для количественной и качественной оценки геномной ДНК человека. Измерение концентрации ДНК спектрофотометрическими и флуорометрическими методами не рекомендуется, поскольку абсолютная концентрация, измеренная физическими методами, может существенно отличаться от эффективной концентрации (т.е. концентрации фрагментов, пригодных для ПЦР).

#### 13.1.3. Подготовка рабочих аликвот

*Подготовка аликвот ДНК для анализа должна выполняться в зоне-1, предназначенной для работы с геномной ДНК и отделенной от всех последующих этапов работы.*

Перед выполнением анализа необходимо подготовить рабочие разведения ДНК с концентрацией 5-25 нг/мкл в объеме 20 мкл, из расчета, что в реакцию рекомендуется внести 200 нг геномной ДНК (допустимый диапазон – 100-500 нг).

ДНК можно разводить в воде, в буфере для элюции ДНК или буфере TE. Аликвоты с разбавленной ДНК можно приготовить заранее и хранить в замороженном виде, а разморозить непосредственно перед выполнением исследования.

### 13.2. Бисульфитная обработка ДНК с последующей очисткой на колонках.

*Бисульфитная обработка ДНК проводится в зоне-1.*

#### Подготовка растворов

Перед первым использованием набора добавьте к Промысловому буферу 13 мл этанола (96%) и нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

#### Исследуемые образцы

Используйте заранее приготовленные аликвоты ДНК объемом 20 мкл, содержащие 200 нг ДНК (допустимый диапазон – 100-500 нг). Если ДНК хранилась в замороженном виде, после размораживания перед обработкой ее необходимо прогреть при 50°C в течение 1-2 минут, перемешать встряхиванием на вортексе, после чего сбросить капли центрифугированием.

Реакцию бисульфитной обработки с исследуемыми образцами необходимо ставить в параллель с двумя контрольными:

- положительный контроль ПКО;
- отрицательный контроль ОКО.

**ВНИМАНИЕ!** ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ НА ВСЕХ ЭТАПАХ ПРОВОДИТСЯ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В НАСТОЛЬНОЙ МИКРОЦЕНТРИФУГЕ НА СКОРОСТИ ОТ 8 000 ДО 10 000 g (НАПРИМЕР, ДЛЯ ЦЕНТРИФУГИ EPPENDORF MINISPIN: ОТ 11 000 ДО 12 000 ОБ/МИН) — СМ. ПРИЛОЖЕНИЕ.

*Колонки перемещать только за наружные выступы крышки, не касаясь остальной части.*

*Перед началом работы рекомендуется поместить «Элюирующий буфер» в термостат на 50 °С.*

1) Подготовьте пробирки для ПЦР объемом 0.2 мл по числу образцов, включая два контрольных, и промаркируйте их. Во все пробирки внесите по 130 мкл **Модифицирующего реагента**.

2) Добавьте в соответствующие маркированные пробирки по 20 мкл раствора ДНК исследуемых образцов, ПКО или ОКО. Закройте крышки, перемешайте на вортексе, сбросьте капли на микроцентрифуге.

3) Проведите реакцию бисульфитной обработки в термоциклере с греющейся крышкой. Для этого поместите пробирки в термоциклер, введите параметры программы и проинкубируйте:

- 98 °С – 8 минут;
- 54 °С – 60 минут;
- 4 °С – хранение (от 2 минут, не более 12 часов).



- 4) Поместите необходимое количество колонок в собирательные пробирки и промаркируйте их.
- 5) В каждую колонку внесите по 600 мкл **Связывающего буфера**, оставьте крышку открытой.
- 6) Сразу внесите в соответствующие колонки по 150 мкл смеси после бисульфитной обработки. Закройте крышки колонок и перемешайте аккуратным переворачиванием, не вынимая колонку из собирательной пробирки.
- 7) Поместите колонки с собирательными пробирками в центрифугу и центрифугируйте 30 секунд. Перенесите колонку в чистую собирательную пробирку.
- 8) Откройте крышки колонок, внесите в каждую по 100 мкл **Промывочного буфера**, после чего закройте крышки и центрифугируйте 30 сек.
- 9) Не вынимая колонки из собирательных пробирок, откройте крышки и внесите в каждую по 200 мкл **Десульфонирующего буфера**, после чего закройте крышки. Инкубируйте при комнатной температуре 20 минут. Центрифугируйте 30 секунд.
- 10) Не вынимая колонки из собирательных пробирок, откройте крышки и внесите в каждую по 200 мкл **Промывочного буфера**, после чего закройте крышки. Центрифугируйте 30 секунд.
- 11) Не вынимая колонки из собирательных пробирок, открыть крышки, повторно внести на колонки по 200 мкл **Промывочного буфера** и закрыть крышки. Центрифугируйте 1 минуту.
- 12) Перенесите колонки в чистые микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл с крышкой, предварительно промаркированные соответственно образцам. Откройте крышки и оставьте на 1 минуту при комнатной температуре, чтобы обсушить фильтр.
- 13) Нанесите в центр мембраны колонки 25 мкл **Элюирующего буфера** (предварительно прогретого) и закройте крышку. Центрифугируйте 30 секунд.
- 14) Не вынимая колонки из собирательных пробирок, открыть крышки, нанести на колонку 25 мкл **Элюирующего буфера** и закрыть крышки. Центрифугируйте 60 секунд.
- 15) Удалите колонки, закройте крышки пробирок, использованные колонки поместите в контейнер с отходами.

*Элюат содержит очищенную модифицированную ДНК, пригодную для ПЦР-анализа.*

*Очищенную ДНК можно сразу использовать в ПЦР или заморозить и хранить при -20°C в течение 1 недели.*

### 13.3. Проведение ПЦР-РВ

Подготовка к ПЦР проводится в зоне-2 («чистая» зона, изолированная от источника матрицы).

Для всей серии образцов (включая контрольные) в параллель выполняются две реакции: на фрагменты генов *MGMT* и *ACTB* (см. рис. 1).

Все реакции рекомендуется проводить в двух технических повторностях.

Количество реакций с реагентами *MGMT* и *ACTB* одинаково:  $2(N+3)$ , где  $N$  – количество исследуемых образцов в одной постановке, плюс три реакции с контролями. Таким образом, общее количество реакций в одном анализе составляет  $4(N+3)$ .

#### Контрольные образцы

Каждая постановка ПЦР должна включать три контрольных образца:

- контроль без матрицы (НТС);
- положительный контроль ПКО после бисульфитной обработки;
- отрицательный контроль ОКО после бисульфитной обработки.

#### Исследуемые образцы

Для реакции используются образцы ДНК после бисульфитной обработки: по 5 мкл элюата (из общего объема 45-55 мкл) на реакцию.

В зоне-2 для подготовки ПЦР для всей серии образцов (включая контрольные) готовятся две общие реакционные смеси без матрицы (первая – с реагентом *MGMT*, вторая – с реагентом *ACTB*).

В зоне-3 общие смеси разносятся по чистым пробиркам (по 20 мкл), после чего в них добавляется анализируемая или контрольная ДНК, или вода (по 5 мкл).

Компонент ПЦР	Реакция <i>MGMT</i>	Реакция <i>ACTB</i>
	Количество компонентов на $N$ образцов, мкл	
5X ЭпиГенТест ПЦР-Смесь	$5.5 \times 2 (N + 3)$	$5.5 \times 2 (N + 3)$
Реагент <i>MGMT</i>	$16.5 \times 2 (N + 3)$	–
Реагент <i>ACTB</i>	–	$16.5 \times 2 (N + 3)$

\* Объем указан с учетом запаса на случай погрешности дозаторов.

- 1) Перед началом работы подготовьте образцы ДНК, поместив их для размораживания в зону-3 для внесения матрицы.
- 2) Рассчитайте необходимый объем общих компонентов ПЦР, исходя из числа образцов, которые планируется проанализировать, включая контрольные. Учтите удвоение объема смесей для выполнения технических повторностей (см. таблицу выше).
- 3) В зоне-3 для подготовки ПЦР разморозьте компоненты набора при комнатной температуре.
- 4) Тщательно перемешайте размороженные компоненты встряхиванием на вортексе, не допуская образования пены, сбросьте капли в микроцентрифуге в течение 5 секунд. Поместите пробирки в рабочий штатив.
- 5) В двух пробирках приготовьте общие реакционные смеси *MGMT* и *ACTB*.
- 6) Тщательно перемешайте обе пробирки, сбросьте капли со стенок пробирок в микроцентрифуге в течение 5 секунд.
- 7) Перенесите пробирки с общими реакционными смесями в зону-3, где будет внесена ДНК.
- 8) Подготовьте пробирки из расчета  $4(N+3)$  или плашки для ПЦР, промаркируйте или сделайте разметку планшета нефлуоресцирующим маркером.

$N$  – количество исследуемых образцов в одной постановке (см. рис. 2, пример расположения образцов на 96-луночной плашке).

*Не используйте маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом, не маркируйте крышки пробирок.*

- 9) Разнесите **общие реакционные смеси** по 20 мкл в соответствующие лунки.
- 10) Размороженные образцы ДНК прогрейте 1-2 минуты при 50°C, тщательно перемешайте на вортексе, сбросьте капли в микроцентрифуге в течение 5 секунд.
- 11) Добавьте по 5 мкл исследуемых образцов ДНК в соответствующие лунки с реакционными смесями.
- 12) Добавьте по 5 мкл контрольных образцов ОКО и ПКО в соответствующие лунки с реакционными смесями.
- 13) Добавьте по 5 мкл воды в лунки с реакционными смесями, предназначенные для НТС.
- 14) Закройте крышки пробирок или заклейте планшет.

15) Сбросьте капли центрифугированием микропланшета или пробирок в течение 15 секунд.

16) Аккуратно перенесите микропланшет или пробирки в блок амплификатора. Запустите программное обеспечение.

17) В управляющей программе прибора ПЦР-РВ откройте созданный ранее шаблон или введите параметры:

- пассивный референсный краситель – отсутствует;
- объем реакционной смеси – 25 мкл;
- программа амплификации:

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация (Hold)	95	3 мин	–
50 циклов (Cycling)	95	15 с	–
	60	60 с	FAM (Green)
1 цикл (Cycling)	4	30 с	–

18) Проведите амплификацию.

*Если не предполагается секвенирование ПЦР-продукта, после окончания амплификации, не открывая пробирки, поместить их в полиэтиленовый пакет или закрытый контейнер и сразу утилизировать.*

19) По окончании работы откроется окно с результатами.

## 14. Анализ результатов

Анализ результатов исследования включает в себя следующие этапы:

- А) Первичная обработка результатов;
- Б) Проверка формальных условий прохождения реакции;
- В) Финальный анализ результатов.

	ПКО	NTC	Образец 2	Образец 4	Образец 6	Образец 8	Образец 10	Образец 12	Образец 14	Образец 16	Образец 18	Образец 20	
MGMT	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ACTB	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MGMT	E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ACTB	G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ОНО		Образец 1	Образец 3	Образец 5	Образец 7	Образец 9	Образец 11	Образец 13	Образец 15	Образец 17	Образец 19	Образец 21	

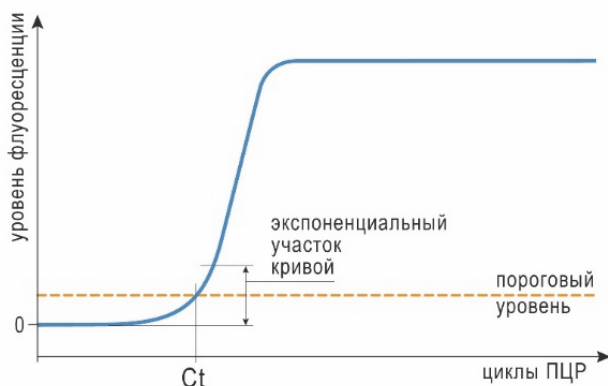
Рисунок 2. Схема рекомендованного порядка расположения образцов в плашке.

## 14.1. Первичная обработка результатов

После окончания ПЦР откроется окно анализа результатов.

1) Выполните обсчет данных об амплификации реакций *MGMT* и *ACTB* с помощью программного обеспечения амплификатора. Необходимо выбрать следующие параметры:

- активный канал – FAM (Green);
- шкала отображения данных – линейная;
- режим отображения данных –  $\Delta Rn$  или  $\Delta R$ ;  
Baseline нужно выставить вручную: с 10-го цикла по цикл, после которого начинается развитие сигнала в реакции с наименьшим значением порогового уровня (обычно по 24-й цикл, но иногда бывает и меньше);
- Threshold (пороговый уровень) выставляется вручную в зависимости от прибора на уровне, соответствующем середине экспоненциальной фазы кривых накопления продукта.



2) Показателем накопления продукта реакции является так называемый "пороговый цикл" ( $C_t$ , threshold cycle), т.е. цикл, на котором интенсивность флуоресценции начинает превышать базовый порог. В приборах CFX96 (Biorad) для обозначения порогового цикла используется значение  $C_q$ , которое при анализе можно приравнять к  $C_t$ . Определите  $C_t$  для всех образцов, сперва выставив вручную значения Baseline и Threshold; рассчитайте и занесите средние значения  $C_t$  для каждого образца в таблицу.

3) Убедитесь, что все реакции с контрольными образцами отвечают требованиям анализа. Оценку гиперметилирования в исследуемых образцах выполняют только после проверки условий анализа для контрольных образцов.

## 14.2. Проверка условий прохождения реакции

### 1) Анализ контрольного образца без матрицы NTC

Проанализируйте сигнал в контрольном образце NTC для обеих реакций *MGMT* и *ACTB*.

При отсутствии контаминации значения  $C_t$  превышают 40 или не определяются.

*Если хотя бы в одном образце NTC флуоресцентный сигнал растет и значение  $C_t \leq 40$ , результаты эксперимента признаются недействительными из-за контаминации реакционной смеси посторонней ДНК (см. Возможные проблемы п.1).*

### 2) Анализ контрольных образцов ОКО и ПКО

В образце ОКО рост флуоресцентного сигнала должен наблюдаться только в реакции *ACTB*, достоверная оценка результатов допустима при значении  $C_t < 30$  (здесь и далее  $C_t$  означает среднее значение между техническими повторностями).

Для ПКО и ОКО значения  $C_t$  в реакции *ACTB* не должны различаться более чем на 1 цикл.

В образце ПКО флуоресцентный сигнал должен расти в обеих реакциях (и *ACTB*, и *MGMT*). Значения  $C_t$  для реакций *MGMT* и *ACTB* ПКО различаются примерно на 5 циклов ( $\Delta C_t = C_{tMGMT} - C_{tACTB}$ ).

Необходимые условия для проведения анализа представлены в таблице:

Образец	<i>MGMT</i>	<i>ACTB</i>	
ПКО	$C_t \leq 36$	$C_t \leq 30$	$ C_t \text{ ПКО} - C_t \text{ ОКО}  \leq 1$
ОКО	$C_t$ не определяется или $C_t > 38$	$C_t \leq 30$	

*При невыполнении любого из этих условий результаты анализа признаются недействительными (см. Возможные проблемы п. 2, 3, 4).*

### **3) Анализ исследуемых образцов**

Проводится после успешного выполнения условий анализа для контрольных образцов.

#### **3-1) Анализ реакции АСТВ**

Флуоресцентный сигнал должен расти во всех образцах. Достоверная оценка результатов допустима при значениях  $Ct \leq 34$ .

*Если в реакции АСТВ значение  $Ct > 34$  или не определяется, результат анализа недостоверен. (см. Возможные проблемы п.5).*

В случае успешного выполнения реакции АСТВ проведите анализ реакции МGMT.

#### **3-2) Анализ реакции МGMT**

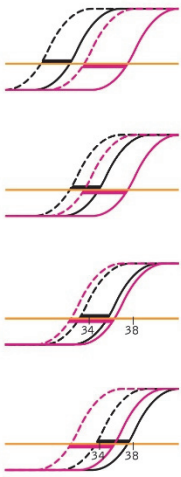
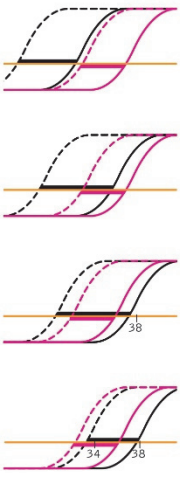
Если  $Ct$  в реакции МGMT не определяется или значение  $Ct > 38$ , исследуемый образец не содержит гиперметилированной ДНК или ее количество ниже чувствительности метода.

Если значение  $Ct \leq 38$ , то достоверное определение в образце гиперметилированной ДНК проводят путем сравнения  $\Delta Ct$  для исследуемого образца и для ПКО, где  $\Delta Ct$  - это разница значений  $Ct$  в реакциях МGMT и АСТВ ( $\Delta Ct = Ct_{MGMT} - Ct_{ACTB}$ ).  $\Delta Ct$  характеризует удельное количество метилированной ДНК в образце (определяется 10% и более гиперметилированной ДНК от суммарной ДНК образца).



### 14.3. Финальный анализ результатов

Наличие гиперметилирования определяется по соотношению  $\Delta Ct$  исследуемого образца и  $\Delta Ct$  ПКО при соблюдении всех условий прохождения реакций (см. рис. 3).

	$Ct_{MGMT}(\text{обр.}) \leq 38$		$Ct_{MGMT}(\text{обр.}) > 38$ или не определяется
$Ct_{ACTB}(\text{обр.}) \leq 34$	$\Delta Ct(\text{обр.}) \leq \Delta Ct \text{ ПКО}$	$\Delta Ct(\text{обр.}) > \Delta Ct \text{ ПКО}$	гиперметилирование НЕ ВЫЯВЛЕНО
	 <p>гиперметилирование ВЫЯВЛЕНО</p>	 <p>гиперметилирование НЕ ВЫЯВЛЕНО</p>	
$Ct_{ACTB}(\text{обр.}) > 34$	РЕЗУЛЬТАТ НЕДОСТОВЕРЕН		

**Рисунок 3.** Возможное взаимное расположение кривых флуоресценции в образцах ПКО (красные линии) и в исследуемом образце (черные линии). Пунктиром обозначены реакции *ACTB*, сплошной линией – реакции *MGMT*.

## 15. Возможные проблемы

1)

образец	реакция	значения Ct в ПЦР
NTC	ACTB	Ct ≤40
	и / или MGMT	Ct ≤40

Рост сигнала в контроле NTC, свидетельствующий о контаминации реакционной смеси посторонней ДНК.

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Посторонняя ДНК попала в компоненты набора для амплификации или в реакционную смесь в момент приготовления реакции. Источником посторонней ДНК могут быть образцы ДНК, ПКО или ОКО после бисульфитной обработки - или ПЦР-продукт, полученный в процессе предыдущих реакций.	Замените воду, используемую для контроля NTC, и повторите реакции. Если проблема сохранилась, замените набор реагентов для амплификации.

2)

образец	реакция	значения Ct в ПЦР
ПКО	ACTB	Ct > 30
	и / или MGMT	Ct > 36
и/или		
ОКО	ACTB	Ct > 30

Реакция прошла неэффективно в одном или двух контрольных образцах.

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Ошибка в постановке ПЦР. Переставьте эксперимент.	Одна из часто возникающих ошибок – плохое перемешивание компонентов. Следите, чтобы после размораживания реагентов, а также в процессе подготовки реакции смеси были тщательно перемешаны.
Ошибка при проведении реакции бисульфитной модификации.	Повторите реакцию бисульфитной обработки для ПКО и ОКО (и для всех исследуемых образцов, у которых $C_t$ реакции $ACTV > 34$ ), после чего проведите ПЦР.
Реактивы испортились при несоблюдении правил хранения или транспортировки.	Проверьте: – срок годности реактивов (указан на коробке); – условия хранения. При необходимости, замените реактивы.

### 3)

образец	реакция	значения $C_t$ в ПЦР
ОКО	<i>MGMT</i>	$C_t \leq 36$

Рост сигнала в реакции *MGMT* в контроле ОКО.

Система контролей не исправна.

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Ошибка в постановке ПЦР. В реакцию ОКО добавлена матрица ПКО или исследуемого образца.	Повторите ПЦР
Контаминация образца ОКО метилированной ДНК или ПЦР-продуктом	Замените набор реагентов для амплификации

4)

образец	реакция	значения Ct в ПЦР
ПКО и ОКО	АСТВ	CtПКО - CtОКО  > 1

Разброс значений в технических повторях реакции АСТВ превышает 1 цикл.

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Ошибка в подготовке ПЦР, в частности, возможно плохое перемешивание компонентов	Повторите ПЦР
Частичная потеря ДНК одного из контрольных образцов при очистке на колонке после бисульфитной обработки	Повторите реакцию бисульфитной обработки для ПКО и ОКО (и для всех исследуемых образцов, у которых Ct реакции АСТВ > 34), после чего проведите ПЦР

5)

образец	реакция	значения Ct в ПЦР
Исследуемый	АСТВ	Ct > 34

Поздний рост контрольного сигнала, реакция прошла неэффективно.

Возможная причина проблемы	Варианты решения
В ПЦР добавлено недостаточно ДНК для получения достоверных результатов.	Повторите бисульфитную обработку образца, увеличив в реакции количество ДНК, а потом выполните ПЦР. В реакцию бисульфитной обработки необходимо добавить не менее 100 нг ДНК.

Перед проведением обработки рекомендуется повторно оценить концентрацию ДНК, используя набор КвантумДНК-156 (AS002, НОМОТЕК).

## 16. Приложения

### 16.1 Замечания по применению набора

Предназначен только для применения в научно-исследовательских целях. Не для применения в медицине или ветеринарии.

Набор реагентов «ЭпиГенТест MGMT» анализирует не все CpG-динуклеотиды промоторной области гена *MGMT* (анализируются только 10 CpG-динуклеотидов из 98). Кроме того, использование набора не позволяет получить информацию о статусе метилирования каждого конкретного CpG-динуклеотида из 10 анализируемых. Положительный результат теста означает метилирование не менее 6 из 10 анализируемых CpG-динуклеотидов в исследуемой ДНК. Несмотря на эти ограничения, используемый метод показывает хорошую корреляцию с другими, в том числе с валидированной методикой метилспецифической ПЦР с детекцией результатов методом агарозного гель-электрофореза, а также с бисульфитным секвенированием и пиросеквенированием [18,19], и при этом отличается от них большей воспроизводимостью и простотой.

Для подтверждения результатов метил-специфической ПЦР можно выполнить секвенирование ДНК, полученную в результате амплификации в реакции *MGMT*. Следует иметь в виду, что пробоподготовка образцов ДНК для секвенирования имеет особенности. Дополнительную информацию по техническим вопросам можно запросить по адресу [md-support@nomotech.ru](mailto:md-support@nomotech.ru)

Аберрантное метилирование промоторной области – не единственный механизм инактивации гена *MGMT*. Помимо него описаны как минимум три: делеция активной копии гена, экспрессия специфических микроРНК (в частности, *miR-181b*, *miR-181d*, *miR-221*, *miR-222*, *miR-767-3p* и *miR-648*) и монометилирование лизина 9 в гистоне 3 (H3K9) [20-22].

Возможна активация транскрипции гена *MGMT* несмотря на аберрантное метилирование его промоторной области. В частности, неоднократно описана реактивация транскрипции гена *MGMT* посредством аберрантного метилирования его «тела», в частности, нескольких регионов в интроне 2 [23]. Данная эпигенетическая модификация является одним из механизмов формирования приобретенной устойчивости опухолевых клеток к алкилирующим агентам.

Статус метилирования любого региона ДНК в опухолевых клетках подвержен потенциальным изменениям. Описано диметилирование промоторной области гена в клетках глиальных опухолей под действием алкилирующих агентов [24]. Поэтому статус метилирования промоторной

области гена *MGMT* в рецидивной или прогрессирующей опухоли не обязательно соответствует статусу ее метилирования в первичной опухоли.

Наличие или отсутствие aberrантного метилирования промоторной области гена *MGMT* не исключает других генетических или эпигенетических нарушений, которые могут приводить к обратному фенотипическому эффекту. В частности, имеются данные, что инактивация системы репарации неспаренных оснований ДНК [25] и мутации в гене *TP53* [26] делают опухолевые клетки устойчивыми к действию темозоломида вне зависимости от статуса метилирования гена *MGMT*.

Аберрантное метилирование промоторной области гена *MGMT* в некоторых случаях выявляется в ДНК нормальных тканей человека [27]. Однако относительная концентрация ДНК с aberrантным метилированием в этих случаях обычно не превышает 2-3%, что существенно ниже порога избирательности набора реагентов «ЭпиГенТест *MGMT*».

Отрицательный результат теста с использованием набора реагентов «ЭпиГенТест *MGMT*» не исключает наличия aberrантного метилирования промоторной области гена *MGMT* в небольшом проценте опухолевых клеток [28].

Активность гена *MGMT* может быть оценена как путем оценки статуса метилирования его промоторной области, так и с помощью количественного анализа его мРНК (методом ОТ-ПЦР-РВ [29]) или белкового продукта (методом ИГХ [30]). Результаты, полученные этими методами, не всегда коррелируют друг с другом.

## 16.2 Рекомендации по выбору режима центрифугирования

Эффективность центрифугирования образца определяется относительным ускорением центрифуги (RCF, relative centrifuge force). Оно зависит от частоты вращения (RPM, rotation per minute) и радиуса центрифугирования. Относительное ускорение центрифуги (RCF) задается как кратное от ускорения свободного падения ( $g$ ) и характеризует условия центрифугирования на любой центрифуге, вне зависимости от радиуса ротора.

Величины RCF и RPM связаны между собой следующей формулой:

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

где  $r$  — радиус ротора в см,

$n$  — частота вращения в оборотах в минуту (RPM).

Например, для центрифуги Eppendorf MiniSpin радиус ротора равен 6 см, таким образом, 10 000  $g$  переводится в 12 000 об/мин.

**ВНИМАНИЕ!** РОТОРЫ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЕЙ НАСТОЛЬНЫХ ЦЕНТРИФУГ ОБЛАДАЮТ РАЗНЫМ РАДИУСОМ, ПОЭТОМУ ОДИНАКОВОЕ КОЛИЧЕСТВО ОБОРОТОВ В МИНУТУ ДЛЯ РАЗНЫХ ЦЕНТРИФУГ БУДЕТ ПРИВОДИТЬ К РАЗНОМУ ОТНОСИТЕЛЬНОМУ УСКОРЕНИЮ, Т.Е. РАЗНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ. ИСПОЛЬЗУЙТЕ ПРИВЕДЕННУЮ ВЫШЕ ФОРМУЛУ ДЛЯ РАСЧЕТА ЧАСТОТЫ ВРАЩЕНИЯ RPM, ЕСЛИ ВАША ЦЕНТРИФУГА НЕ ПОЗВОЛЯЕТ УСТАНОВИТЬ УСКОРЕНИЕ RCF.

При работе с микроцентрифужными колонками относительное ускорение центрифуги (RCF) должно быть не ниже 8 000  $g$  для эффективного центрифугирования — и не выше 10 000  $g$ , чтобы не повредить мембрану колонки.

### 16.3. Список литературы

(жирным шрифтом выделены наиболее важные публикации)

- 1. Stupp, R., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 2005 Mar 10;352(10):987-96**
- 2. Weller, M., et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma // Lancet Oncol. 2014 Aug;15(9):e395-403. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70011-7**
- 3. Wick, W., et al. MGMT testing – the challenges for biomarker- based glioma treatment // Nat Rev Neurol. 2014 Jul;10(7):372-85. doi: 10.1038/nrneurol.2014.100**
4. Gorlia, T, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3 // Lancet Oncol. 2008 Jan;9(1):29-38
5. <http://www.eortc.be/tools/gbmcalculator/model3.aspx>
6. Teo, M., et al. The validity of EORTC GBM prognostic calculator on survival of GBM patients in the West of Scotland // Br J Neurosurg. 2014 Jun;28(3):356-62. doi: 10.3109/02688697.2013.847171
7. Parks, S., et al. Can the prognosis of individual patients with glioblastoma be predicted using an online calculator? // Neuro Oncol. 2013 Aug;15(8):1074-8. doi: 10.1093/neuonc/not033
8. Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend // DNA Repair (Amst). 2007 Aug 1;6(8):1155-60
9. Kaina, B., et al. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents // DNA Repair (Amst). 2007 Aug 1;6(8):1079-9
10. Wick, W. et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial // Lancet Oncol. 13, 707–715 (2012)
11. Malmstrom, A. et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial // Lancet Oncol. 13, 916–926 (2012)
12. Wick W, Meisner C, Hentschel B, et al. . Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation // Neurology 2013;81:1515–1522
13. Herrlinger, U. et al. Survival and quality of life in the randomized, multicenter GLARIUS trial investigating bevacizumab/irinotecan versus standard



temozolomide in newly diagnosed, MGMT-non- methylated glioblastoma patients // *J. Clin. Oncol.* 32 (Suppl. 5),2042 (2014)

14. Hegi, M., Stupp, R. Withholding temozolomide in glioblastoma patients with unmethylated MGMT promoter – still a dilemma? // *Neuro Oncol.* 2015 Nov;17(11):1425-7. doi:10.1093/neuonc/nov198

15. Shacham-Schmueli, E., et al. Response to temozolomide in patients with metastatic colorectal cancer with loss of MGMT expression: a new approach in the era of personalized medicine? // *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):e262-5. doi: 10.1200/JCO.2010.32.0242

16. Barault, et al. Digital PCR quantification of MGMT methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer // *Ann Oncol.* 2015 Sep;26(9):1994-9. doi: 10.1093/annonc/mdv272.

17. Liu, L. & Gerson, S. L. Targeted modulation of MGMT: clinical implications // *Clin. Cancer Res.* 12, 328–331 (2006)

18. Havik, A. B., et al. MGMT promoter methylation in gliomas assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR // *Journal of Translational Medicine* 2012, 10:36

19. Parella, P., et al. High specificity of quantitative methylation - specific PCR analysis or MGMT promoter hypermethylation detection in gliomas // *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:531692. doi: 10.1155/2009/531692

20. Ramalho-Carvalho, J., et al. Altered Expression of MGMT in High-Grade Gliomas Results from the Combined Effect of Epigenetic and Genetic Aberrations // *PloS One.* 2013;8(3):e58206. doi: 10.1371/journal.pone.0058206

21. Zhao, W. et al. The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island // *J. Biochem.* 137, 431–440 (2005)

22. Kreth, S. et al. In human glioblastomas transcript elongation by alternative polyadenylation and miRNA targeting is a potent mechanism of MGMT silencing // *Acta Neuropathol.* 125, 671–681 (2013).

23. Moen, E. L., et al. The role of gene body cytosine modifications in MGMT expression and sensitivity to temozolomide // *Mol Cancer Ther.* 2014 May;13(5):1334-44. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0924

24. Wick, W., Platten, M. Understanding and Targeting Alkylator Resistance in Glioblastoma // *Cancer Discovery.* October 1, 2014 4; 1120 doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0918

25. Van Thuijl, H. F., et al. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment // *Acta Neuropathol.* 2015 Apr;129(4):597-607. doi: 10.1007/s00401-015-1403-6
26. Harris, L. C., et al. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene // *Cancer Res.* 56, 2029–2032 (1996)
27. Menigatti M, et al. Normal colorectal mucosa exhibits sex- and segment-specific susceptibility to DNA methylation at the hMLH1 and MGMT promoters // *Oncogene.* 2009 Feb 12;28(6):899-909. doi: 10.1038/onc.2008.444
28. Parker, N. R., et al. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma // *Sci Rep.* 2016 Mar 4;6:22477. doi: 10.1038/srep22477
29. Shan, N., et al. Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM // *PLoS One.* 2011 Jan 7;6(1):e16146. doi: 10.1371/journal.pone.0016146
30. Brell, M., et al. O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction // *BMC Cancer.* 2011 Jan 26;11:35. doi: 10.1186/1471-2407-11-35

### **Ограничение использования**

Набор предназначен только для научно-исследовательских работ, выполняемых подготовленными специалистами. Не предназначен для применения в медицине или ветеринарии.

## Графические символы

 The symbol consists of the letters "REF" in a bold, sans-serif font, enclosed within a rectangular border.	Номер по каталогу
 A stylized icon of a factory with a sawtooth roof and a chimney on the right side.	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
 An icon of an hourglass with a black shaded bottom bulb.	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
 An icon of a thermometer with a vertical scale and a bulb at the bottom.	Температурный диапазон
 An icon of an open book with a lowercase letter 'i' on the right page.	Обратитесь к инструкции по применению
 A warning symbol consisting of an orange triangle with a black border and a black 'X' in the center.	Осторожно. Вредные для здоровья аллергические (раздражающие) вещества

Техническая поддержка: [md-support@nomotech.ru](mailto:md-support@nomotech.ru)

Изготовитель: ООО «НОМОТЕК»

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10

Тел.: +7 (495) 988-4083

[www.nomotech.ru](http://www.nomotech.ru)