

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый/заместитель Министра
Д.Л.Пиневиц
«26» апреля 2019 г.
Регистрационный № 179-1218



**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ
ГЕНОВ JAK2, CALR И MPL
(инструкция по применению)**

УЧРЕЖДЕНИЕ–РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и
экологии человека»

АВТОРЫ: к.б.н. Силин А.Е., Новик Д.К., к.б.н. Воропаева А.В., к.б.н.
Мартинков В.Н., Тропашко И.Б., Силина А.А., Мартыненко С.М.

Гомель, 2018

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневич

«___» _____ 2019 г.

Регистрационный №

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ
ГЕНОВ JAK2, CALR И MPL
(инструкция по применению)**

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и
экологии человека»

АВТОРЫ:

к.б.н. Силин А.Е., Новик Д.К., к.б.н. Воропаева А.В., к.б.н. Мартинков В.Н.,
Тропашко И.Б., Силина А.А., Мартыненко С.М.

Гомель, 2019

Перечень использованных сокращений:

JAK2 – ген из семейства нерецепторных тирозинкиназ;

CALR – ген, кодирующий белок кальретикулин, играющий важную роль в клеточной пролиферации и дифференцировке, апоптозе, иммуногенной гибели клеток и др.;

MPL – ген рецептора тромбопоэтина;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

НТФ – нуклеотидтрифосфаты;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярно-генетического анализа соматических мутаций V617F гена JAK2, del (тип I) и ins (тип II) гена CALR, W515L и W515K гена MPL посредством аллельспецифической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии и хронического идиопатического миелофиброза. Инструкция предназначена для врачей-специалистов: врачей-гематологов, врачей-генетиков, врачей лабораторной диагностики, оказывающих медицинскую помощь пациентам с истинной полицитемией, эссенциальной тромбоцитемией и хроническим идиопатическим миелофиброзом в стационарных и амбулаторных условиях.

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и др.

Высокоскоростная микроцентрифуга (до 10 000-12 000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» 1,5 мл, твердотельный термостат, микроцентрифуга-вортекс, комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), насос с колбой-ловушкой, ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха, спектрофотометр для определения количества и качества выделенной ДНК, амплификатор ДНК, камера для горизонтального агарозного гель-электрофореза, источник питания постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 200V, УФ-трансиллюминатор с фотокамерой для съемки в УФ свете.

Набор расходных материалов: резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 или 2 мл,

ПЦР-пробирки на 0,2 мл, штативы для пробирок на 1,5 мл и 0,2 мл, стеклянная химическая посуда и др.

Набор реагентов для пробоподготовки и проведения ПЦР включает в себя следующие компоненты: готовый коммерческий набор для экстракции ДНК из крови, буферный раствор для ПЦР, термостабильная ДНК-полимераза для «горячего старта» (Hot-start Taq-полимераза), 25 мМ MgCl₂, смесь НТФ, специфические олигонуклеотидные праймеры 10 мМ р-р, вода ПЦР-качества, компоненты для приготовления агарозного геля, буферных растворов для электрофореза, реагенты для окраски ДНК бромистым этидием.

Показания к применению

Заболевание или патологическое состояние, характеризующееся одним или сочетанием признаков:

- уровень гемоглобина выше 165 г/л у мужчин и 160 г/л у женщин;
- гематокрит более 49% у мужчин и более 48% у женщин при отсутствии причин для симптоматического эритроцитоза;
- постоянный (более 6 месяцев) тромбоцитоз, превышающий $450 \times 10^9/\text{л}$;
- пролиферация мегакариоцитов с признаками атипии без ретикулинового фиброза, сопровождающаяся гиперклеточностью костного мозга, не соответствующей возрасту;
- пролиферация мегакариоцитов с признаками атипии в сочетании с ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом.

Противопоказания для применения

Отсутствуют.

Описание технологии используемого метода

1 Материал для исследования и пробоподготовка

Материалом для выделения ДНК с целью анализа соматических мутаций генов JAK2, CALR и MPL является цельная венозная кровь.

Материал объемом 1 мл после забора переносится в центрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5 М ЭДТА (финальная концентрация 50 мМ). Выделение и очистка образцов ДНК осуществляется обычным доступным способом посредством соответствующих наборов реагентов.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при температуре от +2⁰С до +8⁰С. Более длительное хранение проводится при температуре -20⁰С.

2 Проведение полимеразной цепной реакции

2.1 Специфические олигонуклеотидные праймеры

Анализ мутации V617F осуществляется в пределах 14 экзона гена JAK2 посредством аллельспецифической ПЦР. Для ее тестирования используются три олигонуклеотидных праймера (Таблица 1). Мутации del и ins гена CALR локализованы в 9 экзоне. Для их выявления амплифицируется весь 9-й экзон с использованием при проведении ПЦР двух праймеров (Таблица 1). Каждая из мутации W515L и W515K гена MPL (10 экзон) тестируется посредством аллельспецифической ПЦР с использованием трех праймеров (Таблица 1).

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР

Ген	Мутация	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, п.н.
JAK2	V617F	JAK2-F-2	ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG	364
		JAK2-Com-R	CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA	
		JAK2-F-Mut	AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT	203
CALR	del ins	CALR-F	GCAGCAGAGAAACAAATGAAGG	157
		CALR-R	CTCCTCCTTGTCTCCTCA	
MPL	W515L	MPL-F	GCCGAAGTCTGACCCTTTTT	209
		MPL-R	ACAGAGCGAACCAAGAATGCCTGTTTACA	
		515L-F	GGCCTGCTGCTGCTGAAGTT	124
	W515K	MPL-F	GCCGAAGTCTGACCCTTTTT	209
		MPL-R	ACAGAGCGAACCAAGAATGCCTGTTTACA	
		515K-R	TGTAGTGTGCAGGAAACTGCTT	125

2.2 Условия проведения полимеразной цепной реакции

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР буфер (200 mM Трис-НСl pH 8,3, 200 mM КСl, 50mM (NH₄)₂SO₄), 1 мкл 10mM смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкM праймера, 2,0 мкл 25mM MgCl₂, 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5 ед./мкл), 1 мкл образца ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. Для ПЦР необходимо использовать специальные пробирки объемом 0,2 мл. ПЦР проводится в амплификаторе с подогреваемой крышкой.

Программа для амплификации всех анализируемых фрагментов ДНК выглядит следующим образом: начальная денатурация – 5 минут при 95°C, затем 35 циклов 30 секунд денатурации при 95°C, отжиг праймеров – 30 секунд при 58°C и элонгация 40 секунд при 72°C. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72°C и охлаждение до 4°C.

2.3 Одновременная амплификация фрагментов генов JAK2 и CALR

Для сокращения времени исследования и затрат на реагенты проводят совместную амплификацию фрагментов, в которых локализованы мутация V617F гена JAK2 и del/ins гена CALR. Для этого в ПЦР-смесь вносят 5 праймеров - JAK2-F-2, JAK2-Com-R, JAK2-F-Mut, CALR-F, CALR-R (таблица 1). Программа амплификации остается такой, как при индивидуальной ПЦР.

3 Электрофоретическая детекция результатов ПЦР

3.1 Подготовка геля и буферных растворов

Детекция результатов амплификации осуществляется посредством агарозного гель-электрофореза и окраской бромистым этидием в электрофоретической камере для горизонтального агарозного гель-электрофореза.

Для проведения электрофоретического анализа необходимо приготовить четыре основных раствора реагентов. Для удобства использования изначально готовят концентрированные (стоковые) растворы, из которых затем путем добавления дистиллированной и деионизированной воды формируют рабочие растворы.

1. Подготовка стокового раствора 0,5М EDTA, pH = 8,0

Реагенты	Конц.	На 100 мл
EDTA	0,5 М	18,62 г
NaOH	~0,5 М	2,028 г
H ₂ O		88,95 мл

EDTA не растворяется в воде при кислом pH, поэтому при растворении нужно добавлять щелочь и контролировать pH. Хранить раствор при 4°C.

2. Подготовка трис-ЭДТА-боратного стокового раствора (20×)

Реагенты	Конц. 1×	Конц. 20×	Сток	На 500 мл
Трис	89 мМ	1,78 М	121,14 г/М	107,8 г
Борная кислота	89 мМ	1,78 М	61,83 г/М	55,03 г
EDTA 0,5М, pH 8.0	2 мМ	40 мМ	500 мМ	40 мл
H ₂ O				863,3 мл

Рабочий раствор 1× ТБЕ буфера готовят путем разведения 50 мл стокового раствора буфера (20×) до объема 1 литр дистиллированной водой. Затем добавляют 50 мкл стокового раствора бромистого этидия (1%).

3. Подготовка стокового раствора бромистого этидия 10 мг/мл (1%)

Реагенты	На 10 мл
Бромистый этидий	0,1 г
H ₂ O	до 10 мл

4. Подготовка стокового (4×) загрузочного буфера для образцов

Реагенты	Конц.	На 40 мл
Бромфеноловый синий 2%	0,05%	1 мл
Глицерин 100%	70%	28 мл
H ₂ O		11 мл

3.2 Проведение электрофореза

Процедура проведения электрофореза в стандартной камере для горизонтального агарозного электрофореза выглядит следующим образом:

1. Агарозу для электрофореза в количестве 1,7 г поместить в термостойкую стеклянную колбу на 250 мл. Добавить 100 мл рабочего раствора 1× ТБЕ буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного расплавления агарозы (2 мин.).

2. Залить расплавленную агарозу в специальную форму и установить гребенки в пазы на кювете.

3. Через 20 мин. после полной полимеризации геля извлечь гребенки, не повреждая лунки. Поместить кювету с гелем в камеру для электрофореза. Залить в камеру для электрофореза рабочий раствор 1× ТБЕ буфера так, чтобы слой буфера на 5 мм покрывал гель.

4. Добавить к каждому образцу (25 мкл амплификационной смеси) по 8 мкл 4× загрузочного буфера. Перемешать пипетированием.

5. Через слой буфера в отдельные лунки внести пипеточным дозатором по 12 мкл смеси ампликонов и загрузочного буфера, положительный, отрицательный контроли и маркер молекулярного веса.

6. Закрывать электрофоретическую камеру защитной крышкой и подключить электрофоретическую камеру к источнику питания, соблюдая полярность подключения.

7. Электрофорез проводить при 170 В в течение 25 минут для детекции фрагментов мутаций JAK2 и MPL. Для детекции мутаций гена CALR при индивидуальном тестировании, а также для детекции мутаций генов JAK2 и CALR после совместной амплификации электрофорез проводят в течение 50 минут.

4 Интерпретация результатов анализа

Результат тестирования признается положительным при наличии на электрофореграмме дополнительных фракций, соответствующих по молекулярному весу аллельспецифическим фрагментам для генов JAK2 и MPL либо характерному паттерну фракций в случае мутации del или ins гена CALR. Примеры электрофоретической детекции мутаций генов JAK2, CALR и MPL после индивидуальной для каждой мутации ПЦР, а также после совместной ПЦР для детекции мутаций генов JAK2 и CALR представлены на рисунках 1-4. Для лучшей визуализации изображения представлены в инвертированном виде.

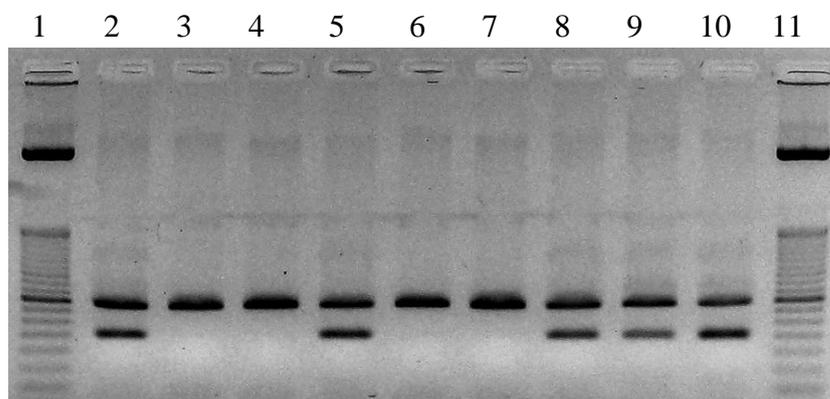


Рисунок 1 – Электрофоретическая детекция соматической мутации V617F гена JAK2 при использовании PCR с тремя различными праймерами в 1,7% агарозном геле. Дорожки 3, 4, 6, 7 – образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 2, 5, 8-10 – образцы, содержащие мутацию V617F гена JAK2, дорожка 1 и 11 – маркер молекулярного веса

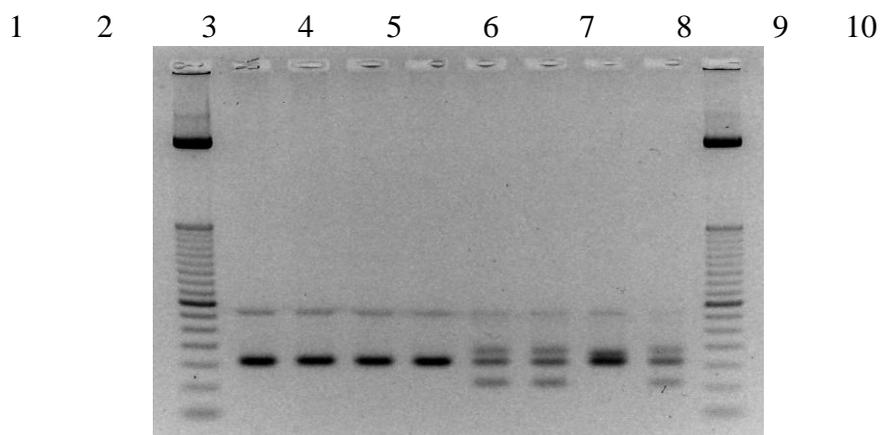


Рисунок 2 – Электрофоретическая детекция соматических мутаций del/ins гена CALR в 1,7% агарозном геле. Дорожки 2-5 – образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 6, 7 и 9 – образцы, содержащие мутацию del гена CALR, дорожка 8 – образец, содержащий мутацию ins гена CALR, дорожка 1 и 10 – маркер молекулярного веса

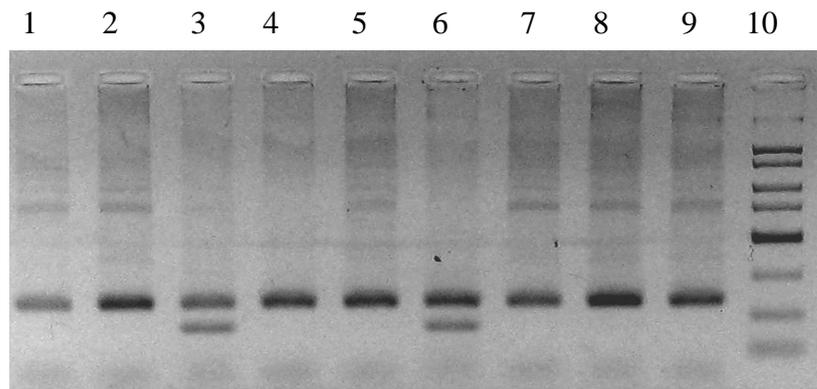


Рисунок 3 –Электрофоретическая детекция соматической мутации W515L гена MPL при использовании PCR с тремя различными праймерами в 1,7% агарозном геле. Дорожки 1, 2, 4, 5, 7-9 – образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 3 и 6 – образцы, содержащие мутацию W515L гена MPL, дорожка 10 – маркер молекулярного веса

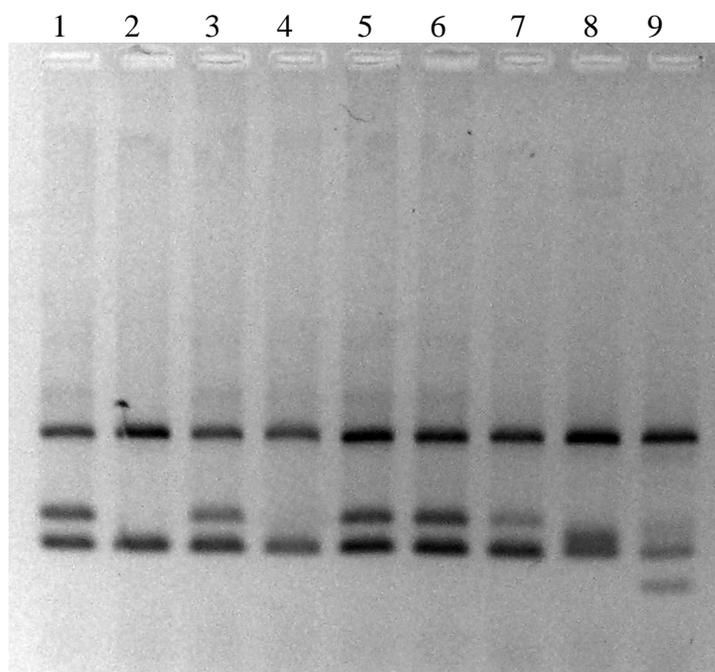


Рисунок 4 –Электрофоретическая детекция результатов совместной ПЦР фрагментов генов JAK2 и CALR в 1,7% агарозном геле. Дорожки 2, 4 – образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 1, 3, 5-7 – образцы, содержащие мутацию V617F гена JAK2, дорожка 8 – образец, содержащий мутацию ins гена CALR; дорожка 9 – образец, содержащий мутацию del гена CALR

Выявление какой-либо из тестируемых мутаций является диагностическим признаком, свидетельствующим о клональном характере миелопролиферации у пациента. Эта информация используется врачом-

гематологом в комплексе с данными клинических, лабораторных и инструментальных видов исследований для верификации диагноза.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

В процессе выполнения молекулярно-генетического анализа наиболее распространенным признаком методических нарушений является слабая амплификация исследуемых фрагментов ДНК либо отсутствие амплификации. Это проявляется в виде нечетких фракций либо в их отсутствии после окраски электрофоретических гелей. Причин неудовлетворительных результатов может быть несколько. Основными из них являются низкая либо крайне высокая концентрация исходного образца ДНК (оптимальная концентрация должна быть в пределах 10-50 нг/мкл), неправильно составленная программа амплификации, ошибки в последовательности нуклеотидов используемых в ПЦР олигонуклеотидных праймеров, использование реагентов с истекшим сроком годности.

При проведении электрофоретической детекции для получения более четкого фракционирования следует использовать только свежеприготовленные буферные растворы и избегать перегрева электрофоретической камеры.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель организации

(подпись)

(инициалы, фамилия)
« ____ » _____ 20__ г.

**АКТ
о практическом использовании результатов исследования**

В _____
(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования*)
Комиссия в составе _____
_____ настоящим подтверждает,
что _____

(название структурного подразделения организации)
*проведено опытно-промышленное испытание (осуществлено внедрение в технологический процесс, в учебный процесс и др.**)*

_____ (указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)
полученных _____
(фамилия, имя, отчество автора (авторов) исследования)
при выполнении программы (проекта, темы НИР**) _____

_____ (название программы, проекта, темы НИР**)
для _____
(указываются решаемые практические задачи)
на основании чего _____
(приводятся конкретные результаты практического использования)

Экономический эффект от использования результатов составил _____
(расчет прилагается)***.

Члены комиссии: _____
(подпись) _____ (инициалы, фамилия)

(дата)