

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

29.11.2013

Регистрационный № 121-1013

**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ТИПИРОВАНИЯ
ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ГЕННЫХ МАРКЕРОВ
У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ НЕЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.Е. Силин, В.Н. Мартинков, Д.К. Новик, канд. мед.
наук Ж.М. Козич, В.К. Шпудейко, И.Б. Тропашко, канд. биол. наук
А.В. Воропаева, А.А. Силина, С.М. Мартыненко

Гомель 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью расширения спектра прогностических маркеров острого нелимфобластного лейкоза (ОНЛЛ). Описанные в инструкции методы могут быть применены для оценки прогноза и эффективности лечения ОНЛЛ с использованием в качестве материала образцов костного мозга и цельной венозной крови. Предназначена для врачей-гематологов, врачей лабораторной диагностики.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Высокоскоростная микроцентрифуга (до 10000–12000×g) с ротором для пробирок типа “eppendorf” 1,5 мл.

Твердотельный термостат.

Микроцентрифуга-вортекс.

Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 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 с постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 200В.

УФ-трансиллюминатор с фотокамерой для съемки в УФ-свете.

Камера для горизонтального или вертикального полиакриламидного гель-электрофореза.

Источник питания с постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 600В.

Камера для окраски гелей с использованием нитрата серебра.

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 и 0,2 мл, стеклянная химическая посуда и др.

Основной набор реагентов для пробоподготовки и проведения ПЦР включает в себя следующие компоненты: готовый коммерческий набор для экстракции ДНК из крови и ткани, буферный раствор для ПЦР, термостабильная ДНК-полимераза для «горячего старта» (Hot Taq-полимераза), 25 мМ MgCl₂, смесь нуклеотидтрифосфатов НТФ (dNTP mix), специфические олигонуклеотидные праймеры 10 мМ р-р, вода ПЦР-качества.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Необходимость дополнительного исследования оценки прогноза при первичном выявлении ОНЛЛ в группе пациентов без цитогенетических нарушений.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Материал для исследования

Материалом для выделения ДНК с целью анализа соматических мутаций генов FLT3, NPM1, p53 и СЕВРА является костный мозг и цельная венозная кровь. Материал после забора переносится в центрифужную пробирку типа “erpendorfE объемом 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5 М ЭДТА (финальная концентрация 50 мМ). Выделение и очистка образцов ДНК осуществляется обычным способом посредством соответствующих наборов реагентов. Наиболее эффективная и экономичная методика предлагается разработчиками наборов, основанных на солевом методе выделения ДНК.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при 2–8°C. Более длительное хранение проводится при -20°C.

2. Проведение полимеразной цепной реакции

2.1. Специфические олигонуклеотидные праймеры

Молекулярно-генетический анализ проводится с использованием ДНК, выделенной как из цельной венозной крови, так и из костного мозга.

Анализ соматических мутаций FLT3-ITD (внутренние тандемные повторы) осуществляется в пределах 14–15-го экзонов, FLT3 D835 — в 20-м экзоне, мутаций гена NPM1 — в 12-м экзоне, p53 — в пределах 5–8-го экзонов, гена СЕВРА в пределах кодирующей области, которая охватывается 4-мя перекрывающимися фрагментами.

Для амплификации фрагментов ДНК, в пределах которых локализованы исследуемые мутации, используются пары специфических олигонуклеотидных праймеров. Их основные характеристики представлены в табл.

Таблица — Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР

Ген/тип мутации	Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5’-3’	Параметры ПЦР		
			MgCl ₂ , мМ	T _{отжига} , °C	циклы
FLT3/ITD	FLT3-14F	GCAATTTAGGTATGAAAGCC AGC	3,0	52	35
	FLT3-15R	CTTTCAGCATTTTGACGGCA ACC			
FLT3/D835	D835-F	CCGCCAGGAACGTGCTTG	3,0	56	40
	D835-R	GCAGCCTCACATTGCCCC			
NPM1	NPM-I11f	GTGGTAGAATGAAAAATAG AT	3,0	65/55	10/35
	NPM-E12r	CTTGGCAATAGAACCTGGAC			
СЕВРА	СЕВРА 1F	CGCCATGCCGGGAGAACTCT	2,5	66	37
	СЕВРА 1R	GCCTTGGCCTTCTCCTGCTG			
	СЕВРА 2F	GACCTGTTCCAGCACAGCCG	2,5	64	37
	СЕВРА 2R	GCGGCTGGTAAGGGAAGAGG			
	СЕВРА 3F	CGCGAGGAGGATGAAGCCAA			

	СЕВРА 3R	CCCGGTA ^{CT} CGTTGCTGTTCTT GTC			
	СЕВРА 4F	GGGCAAGGCCAAGAAGTCGG	2,5	64	37
	СЕВРА 4R	CCTCACGCGCAGTTGCCCAT			
p53	5-MH22	CTGTTCACTTGTGCCCTGA	2,5	61	35
	5-MH20	CAACCAGCCCTGTTCGTCTCT			
	6-MH28	GAGACGACAGGGCTGGTT	2,5	61	35
	6-MH29	CCACTGACAACCACCCTT			
	7-MH30	CCAAGGCGCACTGGCCTC	2,5	68	35
	7-MH19	GAGGCAAGCAGAGGCTGG			
	8-MH23	GGGACAGGTAGGACCTGATT	2,5	61	35
	8-MH33	CACCGCTTCTTGTCTGCTT			
	9-MH34	TTATGCCTCAGATTCACCTTT	2,5	51	35
	9-MH25	CTGGAAACTTCCACTTGAT			

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 мМ Трис-НСl, рН 8,3, 200 мМ КСl, 50 мМ (NH₄)₂SO₄); 1 мкл 10мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера; 2,5–3,0 мкл 25 мМ 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 фрагмента ДНК в пределах 14–15-го экзонов FLT3 (для детекции FLT3-ITD) выглядит следующим образом: начальная денатурация — 5 мин при 95°C, затем 35 циклов — 30 с денатурация при 95°C, 30 с отжиг при 52°C и 30 с элонгация при 72°C. В завершении финальная элонгация 8 мин при 72°C и охлаждение до 4°C.

Программа для амплификации фрагмента ДНК в пределах 20-го экзона FLT3 (для детекции D835) следующая: начальная денатурация — 5 мин при 95°C, затем 40 циклов — 30 с денатурация при 95°C, 30 с отжиг при 56°C и 30 с элонгация при 72°C. В завершении финальная элонгация 8 мин при 72°C и охлаждение до 4°C.

Амплификация фрагмента 12-го экзона NPM1 проводится по следующей программе: начальная денатурация — 5 мин при 95°C, затем 10 циклов 10-секундной денатурации при 95°C, отжиг — 10 с при 65°C и элонгация 30 с при 72°C с уменьшением температуры отжига на 1°C в каждом последующем цикле. Следующие 35 циклов — 10 с денатурация при 95°C, 10 с отжиг при 55°C и 30 с элонгация при 72°C. В завершении финальная элонгация 8 мин при 72°C и охлаждение до 4°C.

Мутация в 835 кодоне гена FLT3 приводит к разрушению сайта рестрикции, специфического к ферменту *EcoRV*. Это дает возможность осуществлять анализ мутации D835 с использованием метода RFLP-PCR. Продукты амплификации после ПЦР обрабатывают специфическим ферментом-рестриктазой и подвергают

электрофоретическому фракционированию. Для проведения рестрикции 10 мкл продуктов амплификации смешивают с 20 мкл реакционной смеси, содержащей 5 ед. фермента *EcoRV*, и инкубируют в твердотельном термостате при температуре и в течение времени, указанных в инструкции по применению фермента.

3. Электрофоретическая детекция результатов ПЦР

3.1. Электрофоретический анализ мутаций генов *FLT3* и *NPM1*

Детекция продуктов ПЦР осуществляется посредством агарозного геле-электрофореза и окраской бромистым этидием в горизонтальной камере. Гелевым и электродным буфером является 1x TBE раствор, pH 8,0, с 0,05% бромистым этидием. Продукты амплификации объемом 7,5 мкл смешиваются с 2,5 мкл загрузочного буфера (70% водный раствор глицерина и 0,05% бромфеноловый синий) и вносятся в лунки 2% агарозного геля. Электрофорез проводится в течение 30 мин при 200 В. Визуализация результатов осуществлялась посредством УФ-трансиллюминатора и камеры для фотодокументирования гелей.

Примеры электрофоретической детекции соматических мутаций *FLT3*-ITD и *NPM1* представлены на рис. 1 и 2.

Для анализа мутации *FLT3* D835 продукты амплификации после обработки рестриктазой *EcoRV* подвергают электрофоретическому фракционированию, как описано выше. В образцах без мутации будут наблюдаться две фракции размером 46 и 68 пар нуклеотидов. В случае мутации в образце кроме двух упомянутых фракций будет присутствовать дополнительная фракция размером 114 пар нуклеотидов.

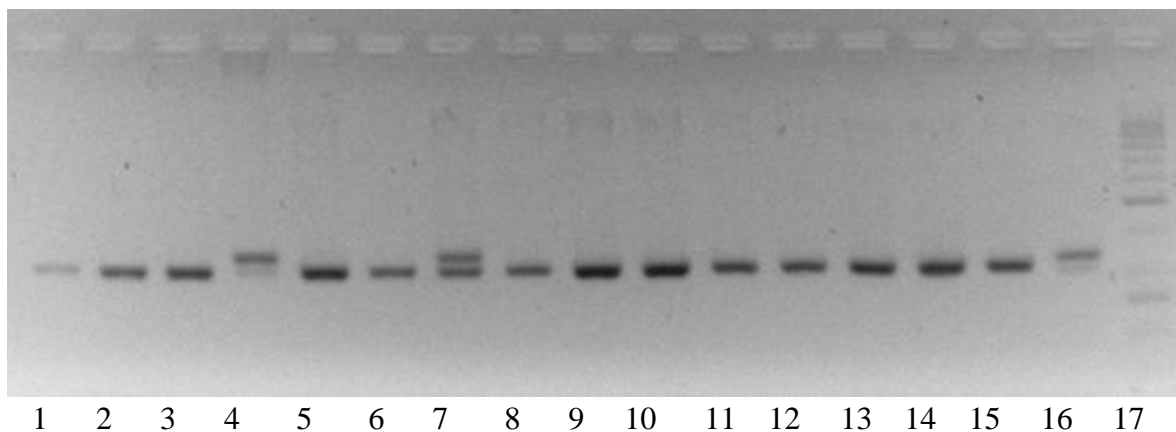


Рисунок 1 — Электрофоретическая детекция продуктов амплификации фрагмента гена *FLT3* в 2% агарозном геле: дорожки 1–3, 5, 6, 8–15 — образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 4, 7 и 16 — образцы, содержащие мутации *FLT3*-ITD; дорожка 17 — маркер молекулярного веса

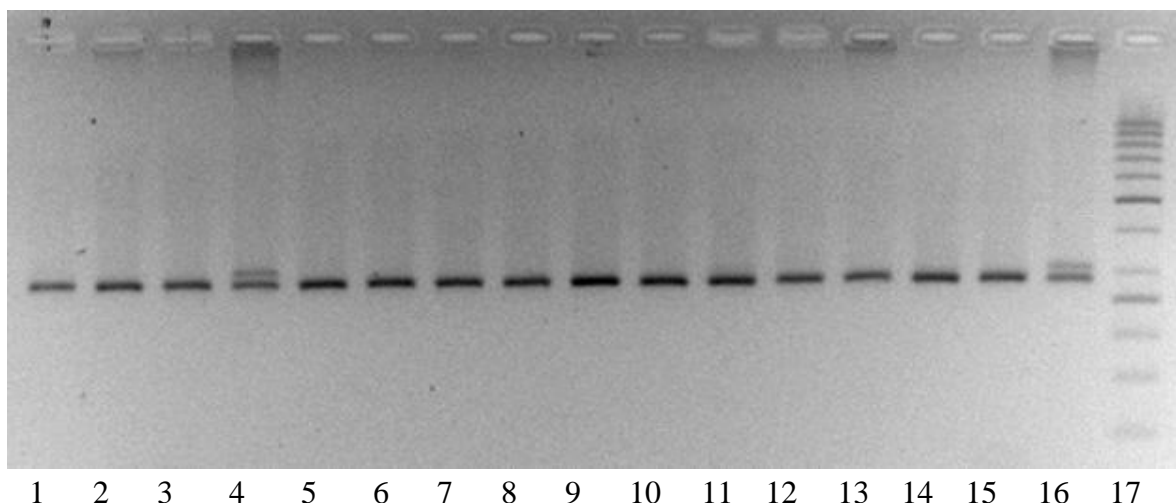


Рисунок 2 — Электрофоретическая детекция продуктов амплификации фрагмента гена NPM1 в 2% агарозном геле: дорожки 1–3, 5–15 — образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 4 и 16 — образцы, содержащие мутацию; дорожка 17 — маркер молекулярного веса

3.2. Электрофоретический анализ мутаций генов p53 и СЕВРА

Для выявления мутаций p53 и СЕВРА необходимо использовать неденатурирующий горизонтальный полиакриламидный гель-электрофорез. Предпочтительна горизонтальная камера для электрофореза с охлаждаемой рабочей поверхностью и толщиной геля в пределах 0,75–1,00 мм. Концентрация акриламида концентрирующей части геля должна быть 4%, разделяющей — 12%. Начальные параметры тока для проведения электрофореза — 600В/100мА/30Вт. Электрофоретическое фракционирование осуществляется в течение 1 ч 45 мин при температуре рабочей поверхности камеры 15°C. Окраска геля после электрофореза проводится по стандартной методике с использованием нитрата серебра.

Метод выявления мутаций p53 и СЕВРА основан на анализе конформационного полиморфизма однонитевой ДНК. Для этого осуществляют денатурацию продуктов амплификации с целью получения однонитевых фрагментов ДНК следующим образом. В пробирку с продуктами амплификации добавляли формамид, содержащий краситель бромфеноловый синий (на 25 мл формамида 10 мг бромфенолового синего) в пропорции 1:1. Затем пробирку помещали в амплификатор или твердотельный термостат на 5 мин при 99°C. По окончании этого этапа пробирку быстро перемещали в кювету с ледяной водой на 5 мин, непосредственно после этого образцы наносили на гель для электрофореза. Конформационный полиморфизм проявляется в виде изменений подвижности или появлению дополнительных фракций в зоне конформатов (область геля, соответствующая подвижности фракции ДНК размером 1000–2000 и более пар нуклеотидов).

Данный метод позволяет также выявлять мутации в виде инсерций и делеций за счет формирования в процессе амплификации гетеродуплексных структур, которые в результате электрофореза проявляются в виде

дополнительных менее подвижных фракций по отношению к основной фракции ДНК (гомодуплексов).

Примеры электрофоретической детекции мутаций методом SSCP и посредством гетеродуплексного анализа представлены на рис. 3.

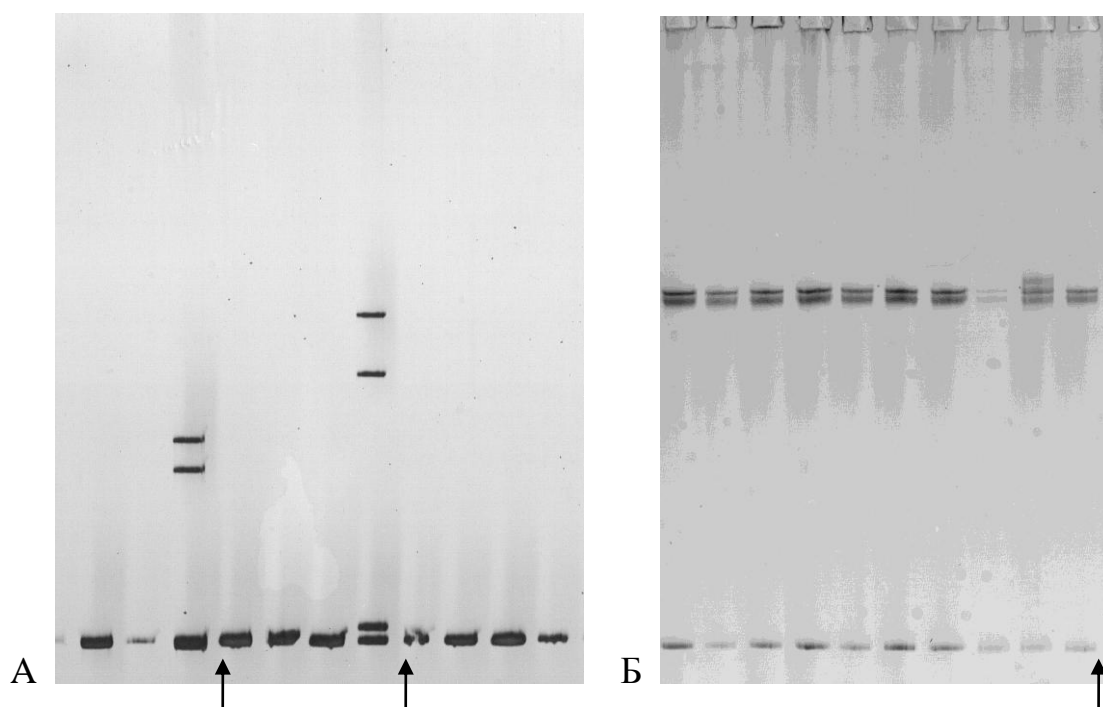


Рисунок 3 — Результаты скрининга мутаций в 4-м регионе гена СЕВРА с использованием полиакриламидного гель-электрофореза. Образцы с выявленными мутациями обозначены стрелками: А — пример мутаций, формирующих гетеродуплексы; Б — пример мутаций, выявляемых в области однонитевых конформатов

4. Интерпретация результатов анализа

В подавляющем большинстве случаев четко выраженные гетеродуплексные структуры (как на рис. 3А) или наличие дополнительных фракций (как на рис. 1 и 2) свидетельствуют о присутствии мутации в виде инсерции или делеции 2-х и более нуклеотидов. Эти мутационные события приводят к крупным нарушениям в структуре кодируемого белка вплоть до его инактивации. Таким образом, подобные мутации являются клинически значимыми.

В случае выявления мутаций, приводящих к конформационному полиморфизму (рис. 3Б), следует проводить дальнейшую расшифровку последовательности исследуемого фрагмента ДНК с целью дифференцировки нейтральных полиморфизмов и клинически значимых мутаций. Данная процедура осуществляется посредством прямого секвенирования фрагментов ДНК как с прямым, так и обратным праймером и последующего анализа с использованием сопоставления полученного результата с открытыми базами данных, распространенными в сети Internet.

Мутации FLT3-ITD и FLT3 D835 определяют неблагоприятный прогноз, мутации гена NPM1 определяют благоприятный прогноз, кроме случаев

сочетания с мутациями FLT3, мутации гена СЕВРА — благоприятный прогноз, мутации гена р53 — неблагоприятный прогноз.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

В ходе молекулярно-генетического анализа выявлено, что наиболее распространенным признаком методических нарушений является слабая амплификация исследуемых фрагментов ДНК либо отсутствие амплификации. Это проявляется в виде нечетких фракций или 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, применение реагентов с истекшим сроком годности.