

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

« 28 » _____ 2019 г.

Регистрационный № 068-0519



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИГЕННЫХ ДЕЛЕЦИЙ В ГЕНЕ
IKZF1 ПРИ В-КЛЕТОЧНЫХ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ
ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ И «МОЛОДЫХ» ВЗРОСЛЫХ
(инструкция по применению)**

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

Вшивкова О.С., к.б.н. Мелешко А.Н.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. . Пиневич

17.05.2019

Регистрационный № 068-0519

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИГЕННЫХ ДЕЛЕЦИЙ
В ГЕНЕ *IKZF1* ПРИ В-КЛЕТОЧНЫХ ОСТРЫХ
ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ
У ДЕТЕЙ И «МОЛОДЫХ» ВЗРОСЛЫХ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: О. С. Вшивкова, канд. биол. наук А. Н. Мелешко

Минск 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В-ОЛЛ — В-клеточный острый лимфобластный лейкоз

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ — нуклеозидтрифосфата

КМ — костный мозг

ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз

п.о. — пар оснований

ПЦР — полимеразная цепная реакция

Taq-ДНК полимеразы — термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения внутригенных делеций в гене *IKZF1* при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и взрослых в возрасте старше 30 лет.

Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику злокачественных новообразований лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей (МКБ-10).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-гематологов, врачей-онкологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, проводящих диагностику и оказывающих медицинскую помощь пациентам с острым лимфобластным лейкозом в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Твердотельный амплификатор (термоциклер) с нагреваемой крышкой.
2. Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 200 мкл.
3. Одноразовые наконечники объемом 10, 100 и 200 мкл с аэрозольным барьером для дозаторов.
4. Центрифуга-вортекс.
5. Эппендорфы объемом 0,2 мкл и 1,5 мл.
6. Автоматизированный генетический анализатор (секвенатор) для капиллярного электрофореза.
7. Расходные материалы для автоматизированного генетического анализатора (секвенатора): 96-луночные планшеты и септы к ним.
8. Морозильная камера с возможностью поддержания температуры -20 °С.
9. Программное обеспечение для визуализации результатов фрагментного анализа.

Реактивы

1. Таq ДНК-полимераза.
2. 10X бесцветный буфер к Таq ДНК-полимеразе, включающий 20-25 мМ $MgCl_2$.
3. Смесь дНТФ.
4. Вода деионизованная.
5. Флуоресцентно-меченные синтетические олигонуклеотиды (праймеры).
6. Синтетические олигонуклеотиды (праймеры).
7. Маркер молекулярного веса, меченный флуорофором ROX, совместимый с автоматизированным генетическим анализатором, предназначенный для определения размеров фрагментов ДНК в диапазоне до 1000 п.о.
8. Формамид высокой степени очистки.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (С91.0).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Материал для исследования и требования к качеству ДНК.
2. Типы внутригенных делеций гена *IKZF1*.
3. Подбор праймеров для ПЦР и характеристика амплифицируемых фрагментов.
4. Состав ПЦР и условия термоциклирования.
5. Подготовка ПЦР-продуктов и фрагментный анализ.
6. Анализ результатов с использованием программного обеспечения.

Материал для исследования и требования к качеству ДНК

Материалом для получения ДНК при анализе внутригенных делеций *IKZF1* служат мононуклеары костного мозга пациентов с В-ОЛЛ, выделенные на градиенте плотности.

ДНК из мононуклеаров КМ может быть получена любым удобным способом, в частности, методом фенол-хлороформной экстракции.

ДНК растворяют в TE буфере (рН = 7,4–8,0) или воде, не содержащей нуклеаз, в термошейкере при 25–40 °С в течение 1 ч. После инкубации раствор ДНК тщательно вортексируют, осаждают капли центрифугированием в течение нескольких секунд. Концентрацию ДНК измеряют на спектрофотометре в 2–3 повторах. Для каждого измерения выписывают значение концентрации, соотношение A260/A280 и A260/A230. Чистая ДНК имеет значение A260/A280 в диапазоне 1,7–2,0 и A260/A230 в диапазоне 2,0–2,3. Рабочий раствор ДНК должен иметь концентрацию 100–150 нг/мкл. Минимальным пороговым уровнем является 10–15 нг/мкл.

В случае соответствия нормам данный материал принимают к исследованию.

Типы внутригенных делеций *IKZF1*

Наиболее изученным и единственным клинически значимым типом aberrаций *IKZF1* при В-ОЛЛ являются внутригенные делеции 15–200 тыс. пар оснований, приводящие к потере нескольких экзонов. Частота таких делеций при В-ОЛЛ по данным различных авторов колеблется от 8 до 15 %, а при лейкозах с транслокацией *BCR-ABL1* — до 80 %. Данный тип мутаций в функциональном отношении является *loss-of-function*, т. е. приводит к потере или нарушению функции белка.

В свою очередь, нарушение функций белка, кодируемого геном *IKZF1*, во всех случаях выражается серьезными нарушениями дифференцировки и функций лимфоцитов, поскольку данный белок выполняет функцию транскрипционного фактора и осуществляет контроль Т- и В-клеточной дифференцировки и созревания лимфоцитов.

Клиническая значимость внутригенных делеций *IKZF1* уже не подлежит сомнению. Наличие внутригенных делеций *IKZF1* является одним из молекулярно-

генетических маркеров, определяющих агрессивность течения лейкоза и повышающих риск рецидива этого заболевания.

Выявление внутригенных делеций *IKZF1* является неотъемлемым звеном лабораторной диагностики первичных В-ОЛЛ как в американских протоколах лечения, так и в европейских (группа VFM). Новый протокол лечения корпоративной группы Минск-Москва-Берлин (протокол MB), который находится в стадии разработки, будет учитывать статус гена *IKZF1* при стратификации пациентов на группы риска, что позволит подобрать им более эффективную схему лечения.

В зависимости от точек разрыва на хромосоме можно выделить несколько типов внутригенных делеций *IKZF1* (рисунок 1). Наиболее часто (не менее 30 % случаев всех внутригенных делеций) обнаруживается делеция с 3 по 6 экзона (ΔEx3-6). Стабильность точек разрыва ДНК можно объяснить расположением в этих экзонах последовательностей, между которыми происходит ошибочная RSS-рекомбинация при V(D)J-реаранжировке про-В клеток из-за aberrантной активации *Rag1/2* генов (контроль над активностью которых осуществляет *IKZF1*).

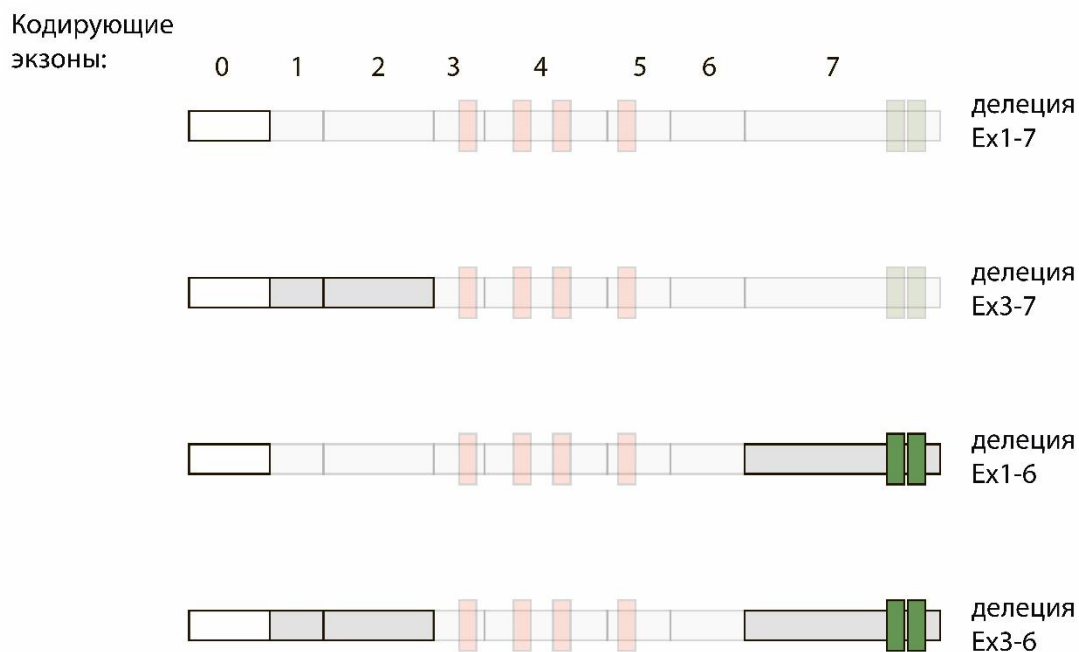


Рисунок 1. — Схематичное изображение точек разрыва при четырех типах внутригенных делеций *IKZF1* (кодирующие экзоны схематично представлены в виде светло-серых прямоугольников, красные и зеленые прямоугольники символизируют домены типа «цинковых пальцев». ДНК-связывающие «цинковые пальцы» кодируются 3–5 экзонами (красные), 7 экзон кодирует два дополнительных «цинковых пальца» для белковых взаимодействий (зеленые))

Вторая распространенная делеция (15 %) также происходит в результате aberrантной RSS-рекомбинации и захватывает экзоны 1-6 (ΔEx1-6). Делеция, вероятнее всего, приводит к образованию нефункционального аллеля гена, поскольку 1 экзон включает в себя стоп-кодон ATG. Частота встречаемости

других известных делеций ($\Delta Ex1-7$ и $\Delta Ex3-7$) по различным данным не превышает 4 %.

В настоящей инструкции изложен метод выявления 4 перечисленных выше типов внутригенных делеций *IKZF1* с использованием мультиплексной ПЦР и фрагментного анализа продуктов ПЦР. Метод позволяет выявить большинство всех известных внутригенных делеций в данном локусе, однако авторы не исключают, что в редких случаях он может быть не чувствительным в отношении крайне редких делеций, точки разрыва при которых могут лежать за пределами зоны амплификации праймеров.

Подбор праймеров для ПЦР и характеристика амплифицируемых фрагментов

Праймеры были сконструированы с использованием программного обеспечения таким образом, чтобы их можно было объединить в одной мультиплексной ПЦР, а длина ампликона и флуоресцентная метка позволяли идентифицировать каждую из 4 типов делеций, а также контрольный фрагмент ДНК. В качестве внутреннего контроля для оценки эффективности амплификации каждого конкретного образца был сконструирован обратный праймер (Intr3_R), специфичный к герминальной последовательности ДНК интрона 3. Праймер работает в паре с прямым праймером Ex3_F, что позволяет амплифицировать фрагмент длиной 731 п.о., меченный флуоресцентной меткой VIC. Контрольный фрагмент должен амплифицироваться во всех анализируемых образцах и является доказательством присутствия ДНК в реакции, ее целостности, а также эффективной амплификации.

При отсутствии рассматриваемых делеций в гене праймеры находятся друг от друга на расстоянии более чем 10 000 п.о., поэтому ПЦР невозможна.

При внутригенных делециях расстояние между праймерами не превышает 1000 п.о.

Таблица 1. — Последовательности праймеров для мультиплексной ПЦР

Название	Последовательность 5'-3'	Метка	Размер
Ex1a_F	CAACAAGTGACCCATCCTTTG	6-FAM	21
Ex1b_F	CACACACTTCAAGATTATGCATTT	6-FAM	24
Ex3_F	TGTGAAGGTCACACCCTCTG	VIC	20
Ex6_R	AAAGAACCCTCAGGCATTCA	–	20
Ex7_R	GGGGACTGGAAGTCACAGAA	–	20
Intr3_R	CACCTTGTGGTCCAGGCTA	–	19

Как видно из таблицы 1, праймеры Ex1a_F и Ex1b_F помечены флуоресцентной меткой 6-FAM (синий канал детекции), а праймер Ex3_F — флуоресцентной меткой VIC (зеленый канал детекции). Все остальные праймеры немаркированные. Нет необходимости использовать именно указанные флуоресцентные метки. При выборе меток следуйте нижеприведенным рекомендациям:

- выбирайте флуоресцентные метки в соответствии с калибровкой конкретного генетического анализатора (секвенатора), на котором будет выполняться фрагментный анализ продуктов ПЦР;

- необходимо, чтобы каналы детекции двух флуоресцентных меток не перекрывались между собой;

- необходимо, чтобы каналы детекции двух флуоресцентных меток не перекрывались с каналом детекции маркера молекулярного веса, который будет использован при фрагментном анализе.

Используя 3 канала флуоресценции (FAM, VIC и ROX), при анализе фрагментов вы получите (таблица 2):

- 1) перманентный зеленый пик (VIC) герминальной ДНК размером 731 п.о. (амплифицированный с помощью праймеров Ex3_F и Intr3_R). Данный пик всегда должен присутствовать при анализе; это позволяет вам быть уверенным, что ДНК была внесена в пробирку. Обратите внимание, что при наличии делеции *IKZF1* пик герминальной ДНК может быть очень низким или даже исчезнуть;

- 2) в случае делеций с 3 по 6 или 3 по 7 экзоны вы получите зеленый пик (VIC) размером 120–230 п.о. (амплифицированный с праймером Ex3_F и праймерами Ex6_R или Ex7_R);

- 3) в случае делеций с 1 по 6 или 1 по 7 экзоны вы получите синий пик (FAM) размером 200–280 п.о. (амплифицированный с помощью праймеров Ex1a_F или Ex1b_F и праймеров Ex6_R или Ex7_R);

- 4) множественные красные пики (ROX), соответствующие маркеру молекулярного веса.

Таблица 2. — Схема возможных взаимодействий праймеров в мультиплексной реакции, размер и тип продуктов амплификации

Прямой праймер	Обратный праймер	Размер продукта, п.о.	Тип делеции
Ex1a_F	Ex7_R	250–280	ΔEx1-7
Ex1b_F		200–240	ΔEx1-6
Ex3_F	Ex6_R	120–190	ΔEx3-6
	Ex7_R	200–230	ΔEx3-7
	Intr3_R	731	Контроль

Состав ПЦР реакции и условия термоциклирования

ПЦР осуществляют с использованием геномной ДНК надлежащего качества (см. «Материал для исследования и требования к качеству ДНК»). Для амплификации фрагментов используют 6 праймеров, последовательности которых приведены выше (таблица 1).

ДНК в количестве 50 нг амплифицируют в реакционном объеме 25 мкл, содержащем 1X буфер для ПЦР, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ смеси дНТФ, 0,4 мМ каждого праймера, 0,25 Ед ДНК-полимеразы с горячим стартом и воду, очищенную от нуклеаз.

ПЦР-смесь раскапывают в отдельные эппендорфы, (0,2 мл), вносят в каждый 50 нг образца ДНК, герметично закрывают, перемешивают содержимое

вortexированием и осаждают центрифугированием в течение нескольких секунд. Загружают эппендорфы в ПЦР-блок. Протокол термоциклирования при использовании указанной ДНК-полимеразы следующий:

95 °С — 4 мин	}	30 циклов
95 °С — 30 с		
60 °С — 30 с		
72 °С — 1 мин		
72 °С — 4 мин		
10 °С — ∞		

При использовании ДНК-полимераз и реагентов различных производителей следует оптимизировать условия термоциклирования. В случае работы с полимеразой без горячего старта ПЦР-смесь следует готовить на льду, а ДНК-полимеразу вносить в смесь в последнюю очередь.

Перед фрагментным анализом наличие и качество ПЦР-продуктов рекомендуется проверять в 2 % агарозном геле, окрашенном этидиумом бромидом.

Подготовка ПЦР-продуктов и фрагментный анализ

Шаг 1. Очистка образцов для фрагментного анализа не требуется. Продукт ПЦР следует развести в 10 раз в воде, не содержащей нуклеаз (таблица 3).

Таблица 3. — Разведение ПЦР-продукта

Компонент смеси	Количество
ПЦР-продукт	2 мкл
Вода, не содержащая нуклеаз	18 мкл

Разведенный ПЦР-продукт тщательно перемешать, осадить центрифугированием и использовать в шаге 2. Разведенный ПЦР-продукт можно хранить при -20 °С в течение 1 мес., при -70 °С — длительное время.

Шаг 2. Перед разделением фрагментов в секвенаторе методом капиллярного электрофореза разведенный продукт ПЦР смешивают с высокоочищенным формамидом в соотношении 1:9 (таблица 4). Формамид действует как денатурирующий агент и обеспечивает хорошее разделение фрагментов ДНК во время денатурации.

Кроме того, в каждом образце обязательно должен присутствовать маркер молекулярного веса (стандарт длины), меченный флуорофором ROX. Стандарт длины нужен для определения длин фрагментов ДНК методом экстраполяции.

Таблица 4. — Подготовка продукта ПЦР к фрагментному анализу

Компонент смеси	Количество
Разведенный ПЦР-продукт	0,7 мкл
Формамид	9 мкл
Маркер молекулярного веса	0,3 мкл

Смесь тщательно перемешать, осадить центрифугированием и денатурировать при 98 °С в течение 5 мин. Затем резко охладить до 4 °С. Загрузить денатурированный образец (10 мкл) в лунку 96-луночного планшета, закрыть септой и загрузить в секвенатор. Произвести капиллярный электрофорез.

Стандартные настройки секвенатора Applied Biosystems 3130 для капиллярного электрофореза:

- вольтаж пробега: 15 000;
- вольтаж инъекции: 3 000;
- мощность лазера: 15;
- время инъекции: 5 с;
- давление в камере: ~7000 +.

Анализ результатов фрагментного анализа с использованием программного обеспечения

Фрагментный анализ представляет собой разделение фрагментов в секвенаторе методом капиллярного электрофореза и последующий анализ результатов в специальных программах. Для просмотра результатов фрагментного анализа разработано множество лицензионных продуктов, предназначенных для анализа больших сложных мультилокусных систем (например, определение личности человека или отцовства), а также бесплатные версии программного обеспечения.

На рисунке 2 приведен пример визуализации 4 различных типов внутригенных делеций *IKZF1*:

1) зеленый пик (VIC) размером около 120–190 п.о. свидетельствует о наличии у пациента внутригенной делеции *IKZF1* с 3 по 6 экзоны (рисунок 2 а);

2) зеленый пик (VIC) размером около 200–230 п.о. свидетельствует о наличии у пациента внутригенной делеции *IKZF1* с 3 по 7 экзоны (рисунок 2 б);

3) синий пик (FAM) размером около 200–240 п.о. свидетельствует о наличии у пациента внутригенной делеции *IKZF1* с 1 по 6 экзоны (рисунок 2 в);

4) синий пик (FAM) размером около 250–280 п.о. свидетельствует о наличии у пациента внутригенной делеции *IKZF1* с 1 по 7 экзоны (рисунок 2 г);

5) контрольный синий пик (FAM) размером около 730 п.о. — фрагмент герминальной ДНК должен амплифицироваться во всех анализируемых образцах и является доказательством присутствия ДНК в реакции, ее целостности, а также эффективной амплификации (рисунок 2, а, б). Обратите внимание, что при наличии делеции *IKZF1* пик герминальной ДНК может быть очень низким или даже исчезнуть (рисунок 2 в, г);

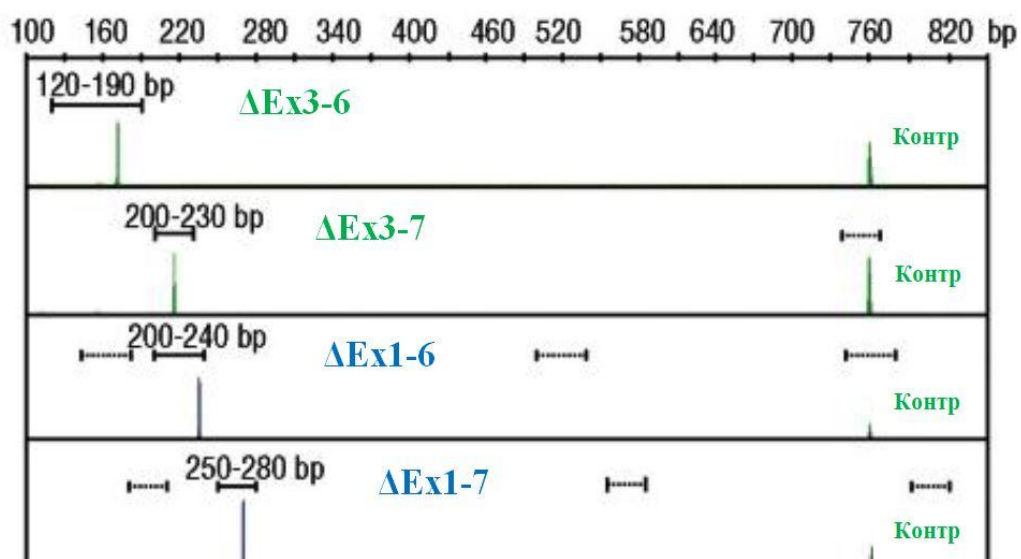


Рисунок 2. — Пример фрагментного анализа различных типов внутригенных делеций IKZF1, амплифицированных с помощью метода мультиплексной ПЦР

6) отсутствие пиков в диапазоне от 200 до 300 п.о. по каналам FAM и VIC свидетельствует об отсутствии у пациента внутригенных делеций IKZF1. В данном случае контрольный синий пик (FAM) герминальной ДНК размером около 730 п.о. должен присутствовать в обязательном порядке;

7) множественные пики в красном канале (ROX) соответствуют фрагментам маркера молекулярного веса (не представлено на рисунке 2).