

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л.Богдан

«12» декабря 2020 г.

Регистрационный № 122-1120



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**
(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ: Луцкович Д.В., Гиль А.В., Столярова Е.А., к.б.н. Липай Н.В.,
к.б.н. Мелешко А.Н.

Минск, 2020

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Е. Л. Богдан

29.12.2020

Регистрационный № 122-1120

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: Д. В. Луцкович, А. В. Гиль, Е. А. Столярова, канд. биол. наук Н. В. Липай,
канд. биол. наук А. Н. Мелешко

Минск 2020

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Ig – иммуноглобулин

TCR – Т-клеточный рецептор

АСО – аллель специфические олигонуклеотиды

ООК – остаточные опухолевые клетки

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ALB – альбумин (референсный ген)

ТЭ – раствор, содержащий Трис и ЭДТА

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод мониторинга минимальной остаточной болезни в ходе лечения острого лимфобластного лейкоза. Мишенью для определения опухолевых клеток являются клональные реаранжировки генов иммуноглобулина и TCR, происходящие на ранних этапах дифференцировки лимфоцитов и образующие специфическую мишень для лейкозных клеток.

В основе метода лежит ПЦР-идентификация клональных реаранжировок, дополненный гетеродуплексным анализом полученных продуктов в полиакриламидном геле и секвенированием ДНК. После идентификации реаранжировки подбирается АСО, праймер, используемый в дальнейшем для мониторинга остаточной болезни методом RQ-PCR.

Заключение по минимальной остаточной болезни выдается в виде качественного (положительная, отрицательная) и количественного (в натуральном виде числа или проценте опухолевых клеток в костном мозге) заключения, основанного на интерпретации результатов RQ-PCR анализа.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-гематологов, врачей-онкологов, врачей-иммунологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными онкогематологическими заболеваниями, находящимся в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделений дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

1. Дозаторы с переменным объемом.
2. Вортекс.
3. Микроцентрифуга (MiniSpin).
4. Термоциклер для ПЦР.
5. Термоциклер для ПЦР в реальном времени.
6. Компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме реального времени, хранения данных и анализа.
7. Камера для горизонтального электрофореза.
8. Камера для вертикального электрофореза и набор стекол для заливки геля.
9. Центрифуга для пробирок с адаптером под пробирки 15 и 50 мл.
10. Центрифуга с охлаждением на 14 000 об/мин и адаптерами под пробирки типа «эппендорф» 1,5–2 мл.
11. Вакуумный аспиратор.
12. Морозильная камера с температурным режимом до -20 °С.
13. Спектрофотометр.
14. Штатив с охлаждением под пробирки 0,5 и 0,2 мл.
15. Ультрафиолетовый трансиллюминатор.

16. Документирующая система для визуализации результатов электрофореза.
17. Автоматический капиллярный ДНК-секвенатор.

Реагенты

1. Дистиллированная/деионизированная вода.
2. Буфер для лизиса эритроцитов (RCLB).
3. Натрий-фосфатный буфер (ФСБ, pH = 7,5).
4. Раствор фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл; гистопак или лимфопреп).
5. Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт.
6. Изопропанол.
7. Спирт 96 %.
8. Термостабильная Taq ДНК-полимераза.
9. Маркер молекулярного веса.
10. Агароза.
11. Аммоний пероксидсульфат.
12. Акриламид.
13. Мастермикс для ПЦР в реальном времени.
14. Праймеры и флуоресцентные пробы.

Расходный материал

1. Перчатки нитриловые\латексные неопудренные.
2. Пробирки с консервантом (ЭДТА).
3. Дезинфицирующий раствор без содержания спиртов.
4. Емкость для утилизации отходов и дезсредства.
5. Одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200, 1000 мкл.
6. Одноразовые пробирки типа «эппендорф» от 0,2 мкл до 1,5 мл.
7. Одноразовые пробирки объемом 15 мл.
8. Одноразовая пластиковая посуда для постановки ПЦР в режиме реального времени, микропробирки, стрипы, 96-луночные плашки.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острый лимфобластный лейкоз (МКБ-10: С91.0).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

Характеристика олигонуклеотидов (праймеров)

Таблица 1. — Последовательности праймеров, используемых для ПЦР-амплификации реаранжировок генов Ig\TCR

Праймер	Последовательность	Праймер	Последовательность
Ген TCRD		Ген IgH	
Vd1-5'	ACTCAAGCCCAGTCATCAGTATCC	VH1LF	CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG
Vd2-5'	ACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGG	VH2LF	TCCTGCGCTGGTGAAAGCCACACA
Jd1/2R_CE	CTTGGTTCCACAGTCACACG	VH3LF	GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC A
Vd2_LF	GGACATCGAGTCATGTCAGCC	VH4aLF	TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC
Dd3_LF	AGGGAAATGGCACTTTTGCC	VH5LF	GAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAA
Dd2s_CE	TTTCAGGGGTATTGTGGATGG	VH6LF	CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG
Dd3s_CE	TGTTTGTCTCCTGAGGCATG	JHLF	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
Ja29	GGCAAAAGCATTCTAGGTACA	JH consensus	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC
Ja9	TTTAACTGGCAGACAAAАCTATG		
Ген TCRG		Ген IgK	
Vgl-5'	CAGGCCGACTGGGTCATCTGC	VK1-5'	GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
Vgll-5'	CAGCCCGCCTGGAATGTGTGG	VKll-5'	TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC
Vglll-5'	GACATACCTTGCAAGATATCGAGC	VKlll-5'	GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
VglV-5'	CTGAAATATCTATTTCCAGACCAGC	Jk1-4_R	CTTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
Jg1.1/2.1-3'	TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC	Jk5_R	CTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
Jgl.3/2.3-5'	AATGTTGTATTCTTCCGATACTTACC	Kde-3'	CCCTTCATAGACCCTTCAGGCA C
Ген TCRB			
Vβ2	AACTATGTTTTGGTATCGTCA	Vβ21	TACCCTTTACTGGTACCGGCAG
Vβ4	CACGATGTTCTGGTACCGTCAGCA	Vβ22	ATACTTCTATTGGTACAGACAAATCT
Vβ5/1	CAGTGTGTCCTGGTACCAACAG	Vβ23/8b	CACGGTCTACTGGTACCAGCA
Vβ6a/11	AACCCTTTATTGGTACCGACA	Vβ24	CGTCATGTACTGGTACCAGCA
Vβ6b/25	ATCCCTTTTTTGGTACCAACAG	Jβ1.1A	CTTACCTACAАCTGTGAATCTGTG

Vβ6c	AACCCTTTATTGGTATCAACAG	Jβ1.2A	CTTACCTACAACGGTTAACCTG GTC
Vβ7	CGCTATGTATTGGTACAAGCA	Jβ1.3A	CTTACCTACAACAGTGAGCCAA CTT
Vβ8a	CTCCCGTTTTCTGGTACAGACA GAC	Jβ1.4A	CATACCCAAGACAGAGAGCTG GGTTC
Vβ9	CGCTATGTATTGGTATAAACAG	Jβ1.5A	CTTACCTAGGATGGAGAGTCGA GTC
Vβ10	TTATGTTTACTGGTATCGTAAGA AGC	Jβ1.6A	CATACCTGTACAGTGAGCCTG
Vβ11	CAAAATGTAAGTGGTATCAACAA	Jβ2.1B	CCTTCTTACCTAGCACGGTGA
Vβ12a/3/13a/ 15	ATACATGTAAGTGGTATCGACAA GAC	Jβ2.2A	CTTACCCAGTACGGTCAGCCT
Vβ13b	GGCCATGTAAGTGGTATAGACAA G	Jβ2.3B	CCCGCTTACCGAGCACTGTCA
Vβ13c/12b/1 4	GTATATGTCCTGGTATCGACAA GA	Jβ2.4B	CCAGCTTACCCAGCACTGAGA
Vβ16	TAACCTTTATTGGTATCGACGTG T	Jβ2.5B	CGCGCACACCGAGCAC
Vβ17	GGCCATGTAAGTGGTACCGACA	Jβ2.6A	CTCGCCCAGCACGGTCAGCCT
Vβ18	TCATGTTTACTGGTATCGGCAG	Jβ2.7A	CTTACCTGTAACCGTGAGCCTG
Vβ19	TTATGTTTATTGGTATCAACAGA ATCA	DB1	GCCAAACAGCCTTACAAAGAC
Vβ20	CAACCTATACTGGTACCGACA	DB2	TTCCAAGCCCCACACAGTC

Таблица 2. — Последовательности праймеров и флуоресцентных проб, используемых для ПЦР в режиме реального времени

Праймер	Последовательность	Зонд	Последовательность
Для гена TCRD			
Jd1R	TGCCTTAACCTTAAACTTCAGA	Jd1TM	FAM- AACCCGTGTGACTGTGGAACCAAGT -BHQ
Vd2F	CCCAAGGTAACACAATCACTT	Vd2TM	FAM- TACCGAGAAAAGGACATCTATGGCC CT-BHQ
Dd3R	CTGCTTGCTGTGTTTGTCTCCT	Dd3TM	FAM- ATATCCTCACCTGGGTCCCATGCC T-BHQ
Для гена TCRG			
JPg1/2 R	ACCCTGAAAAATTGCTGTTCGT	JPg1/2T M	FAM- TACTGAGGCCAGGAATGTGACATAT TCAG-BHQ
Jg1/2R	GTTTAATAATTCCTGCTTTCCC TCTAT	Jg1/2TM	FAM- TCCGATACTTACCTGTGACAACAAG TGT-BHQ

Для гена IgH			
R-JH1-intron	CGCTATCCCCAGACAGCAGA	T-JH1.2.4.5	FAM-CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG-BHQ
R-JH2-intron	GGTGCCTGGACAGAGAAGACT	T-JH1.2.4.5	FAM-CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG-BHQ
R-JH3-intron	AGGCAGAAGGAAAGCCATCTTAC	T-JH3	FAM-CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA-BHQ
R-JH4-intron	CAGAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGT	T-JH1.2.4.5	FAM-CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG-BHQ
R-JH5-intron	AGAGAGGGGGTGGTGAGGACT	T-JH1.2.4.5	FAM-CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG-BHQ
R-JH6-intron	GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT	T-JH6	FAM-CACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA-BHQ
Для гена IgK			
IGKJ1_R	AAGGATATCAGAGGCTGATTGCAG	IGKJ1_TM	FAM-TTTGCTTCTCAGTTGTCTGTGTC-BHQ
IGKJ2_R	TCCCCTCCTCTGTACCTAACC	IGKJ2_TM	FAM-CGGATGCCAGGGATCTAACA-BHQ
IGKJ3_R	ATTTACTTCTGGGTCACCAGGTТ	IGKJ3_TM	FAM-TTTGTGCAAGTTTTGTGATATTTTGG-BHQ
IGKJ4_R	ATCTCAAACACAAAAACGCTCCA	IGKJ4_TM	FAM-CGTAAGTGCACCTTTCCTAATGCTTTT-BHQ
IGKJ5_R	GCCCTCATTTACCAATCTTTACCA	IGKJ5_TM	FAM-TGAAATTTGGGTCTGATGGCCA-BHQ
kdeR	AGACCCTTCAGGCACATGCTT	kdeTM	FAM-TCCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCT-BHQ
Для гена TCRB			
R-Jb1.1	TGTGACGATCTGCAAAAGAAC	TM-Jb1.1	FAM-TTGGACAAGGCACCAGACTCACAGTTG-BHQ
R-Jb1.2	GACCCCCAGCCTTACCTACAA	TM-Jb1.2	FAM-CCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAA-BHQ
R-Jb1.3	GCTGTCCAGCCTTGACTTACTCA	TM-Jb1.3	FAM-TTGGAGAGGGAAGTTGGCTCACTGTTAG-BHQ

R- Jb1.4	ACCTTATGTACACTATCCCGAA AGAA	TM- Jb1.4	FAM- TGGCAGTGGAACCCAGCAGCTCTCT GTC-BHQ
R- Jb1.5	CCCTGATTCTGCCAACTTACCT A	TM- Jb1.5	FAM- CAGCATTTTGGTGATGGGACTCGAC TCTC-BHQ
R- Jb1.6	AGCCCCCATACTGTACACAGT	TM- Jb1.6	FAM- CCACTTTGGGAATGGGACCAGGCT- BHQ
R- Jb2.1	CCCTTCTTACCTAGCACGGTGA	TM- Jb2.1	FAM- ATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGA- BHQ
R- Jb2.2	CAACCGCCTCCTTACCCA	TM- Jb2.2	FAM- TTGGAGAAGGCTCTAGGCTGACCGT A-BHQ
R- Jb2.3	CCCGCTTACCGAGCACTGT	TM- Jb2.3	FAM- AGTATTTTGGCCCAGGCACCCGG- BHQ
R- Jb2.4	GGCGGCCCCAGCTTAC	TM- Jb2.4	FAM-CGGGACCCGGCTCTCAGTGCT- BHQ
R- Jb2.5	TCACCGAGCACCAGGAGC	TM- Jb2.5	FAM- CAGTACTTCGGGCCAGGCACGC- BHQ
R- Jb2.6	TCACCCAGCACGGTCAGC	TM- Jb2.6	FAM- AACGTCCTGACTTTCGGGGCCG- BHQ
R- Jb2.7	GCTGGAAGGTGGGGAGA	TM- Jb2.7	FAM-CGGGCACCAGGCTCACGGTC- BHQ

Таблица 3. — Последовательности праймеров и флуоресцентных проб к двум альтернативным контрольным генам для ПЦР в режиме реального времени

Ген	Праймер	Последовательность
β-глобин	β-glob_F	TATTTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG
	β-glob_R	CTGACACAACCTGTGTCTCACTAGC
	β-glob_TM	FAM-CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACT-BHQ
Альбумин	Albumin1	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT
	Albumin2	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
	Albumin-TM	FAM-TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA-BHQ

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Для измерения остаточных опухолевых клеток проводится несколько этапов.

Этап 1. Подготовка материала для исследования

В качестве материала для исследования используют пунктат костного мозга.

Выделение мононуклеаров из пунктата костного мозга

Образец костного мозга разводят физиологическим раствором в 2 раза, после медленно наслаивают в пробирке на гистопак, в соотношении 1:4 (гистопак:образец)

и центрифугируют в течение 30 мин при 1500 об/мин. Пипеткой с тонким концом собирают белое кольцо, которое образуется на границе раздела фаз и смешивают с буфером для лизиса эритроцитов в соотношении 1:3, инкубируют 10 мин, после чего центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин. В случае наличия осадка эритроцитов этап отмывания лизирующим буфером повторяют, затем отмывают лейкоциты натрий-фосфатным буфером. Отмытые в натрий-фосфатном буфере клетки в виде концентрированной суспензии тщательно перемешивают (для разрушения осадка и комков клеток), распределяют в пробирки объемом 2,0 мл в количестве 5–10 млн и объеме суспензии 100 мкл.

Выделение ДНК из мононуклеаров пунктата костного мозга

Для выделения ДНК в пробирку с клетками добавляют лизирующий буфер для разрушения клеточной стенки лейкоцитов в объеме 100 мкл на 1 млн клеток. Лизис осуществляют при 50–55 °С с непрерывным перемешиванием в течение 2–3 ч. Далее выполняется экстракция ДНК с добавлением 500 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1), тщательно перемешивают и центрифугируют 1 мин при 5000 об/мин. Большим наконечником отбирают верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, которую переносят в новую пробирку. Далее производят преципитацию ДНК равным объемом изопропанола. Пробирку несколько раз перемешивают переворачиванием и оставляют при температуре 0–4 °С на 20–30 мин. Смесь центрифугируют 20 мин при 14 000 об/мин с охлаждением. После осаждения осадок ДНК отмывают в 1 мл 70 % этанола и высушивают.

Растворение и измерение концентрации ДНК

Стандартное растворение осуществляют в ТЭ-буфере. ДНК растворяют в термомиксере при 25–37 °С в течение 1 ч. После инкубации раствор ДНК тщательно перемешивают, осаждают капли центрифугированием 5–10 с. Измерение выполняют на спектрофотометре на трех независимых порциях ДНК по 2 мкл, которые отбирают из пробирки с ДНК новым типом после 4–5 пипетирований для каждого набора. Для каждого измерения выписывают значение концентрации, соотношение A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} . Чистая ДНК имеет значение A_{260}/A_{280} в диапазоне 1,7–2,0 и A_{260}/A_{230} в диапазоне 2,0–2,3. В случае соответствия нормам раствор ДНК разводится до конечной концентрации 100 нг/мкл и используется для дальнейшего исследования.

Этап 2. Идентификация реаранжировок генов Ig\TCR методом ПЦ-амплификации и подбор аллель-специфических олигонуклеотидов

ПЦР-амплификация

ПЦР-амплификация выполняется с диагностической ДНК с установленной панелью праймеров. Полная панель праймеров представлена в таблице 4.

Таблица 4. — Характеристика и условное обозначение праймеров, тип реаранжировки и температурный режим амплификации

Ген	Міх (условное обозначение)	Реаранжировка	Праймеры	Размер ПЦ-продукта, п.н.	Тип острого лимфобластного лейкоза	Протокол
TCRD	mixA	Vδ1-Jδ1	Vδ1-5' : Jδ1/2R_CE	320	T-ОЛЛ	60°_35cl s
	mixA2	Vδ2-Jδ1	Vδ2LF : Jδ1/2R_CE	310	T-ОЛЛ	60°_35cl s
	mixB	Vδ2-Dδ3	Vδ2LF : Dδ3LF	340-350	B- и T-ОЛЛ	60°_35cl s
	mixC	Dδ2-Dδ3	Dδ2s_CE : Dδ3s_CE	286	B- и T-ОЛЛ	64°_35cl s
	mixD	Dδ2-Jδ1	Dδ2s_CE : Jδ1/2R_CE	155-170	B- и T-ОЛЛ	60°_35cl s
	mixE	Vδ2-Jα9, Jα24	Vδ2-5' : Jα9+Jα24	400-450	B- и T-ОЛЛ	60°_35cl s
TCRG	mixF	VγI - Jγ1.1/2.1	VγI-5' : Jγ1.1/2.1-3'	330	B- и T-ОЛЛ	60°_35cl s
	mixF''	VγII,III,IV - Jγ1.1/2.1	VγII,III,IV-5' : Jγ1.1/2.1-3'	320-350	B- и T-ОЛЛ	60°_35cl s
	mixG	VγI - Jγ1.3/2.3	VγI-5' : Jγ1.3/2.3-5'	340	B- и T-ОЛЛ	60°_35cl s
	mixH	VγII - Jγ1.3/2.3	VγII-5' : Jγ1.3/2.3-5'	330	B- и T-ОЛЛ	60°_35cl s
	mixJ	VγIII,IV - Jγ1.3/2.3	VγIII-5' + VγIV-5' : Jγ1.3/2.3-5'	330-360	B- и T-ОЛЛ	60°_35cl s
IgH	VH1	VH1 - JH	VH1LF : JHLF	310-330	B- и T-ОЛЛ	66°_30cl s
	VH2	VH2 - JH	VH2LF : JHLF	310-332	B- и T-ОЛЛ	66°_30cl s
	VH3	VH3 - JH	VH3LF : JHLF	310-335	B- и T-ОЛЛ	66°_30cl s
	VH4	VH4 - JH	VH4LF : JHLF	310-337	B- и T-ОЛЛ	66°_30cl s
	VH5	VH5 - JH	VH5LF : JHLF	310-339	B- и T-ОЛЛ	66°_30cl s
	VH6	VH6 - JH	VH6LF : JHLF	310-342	B- и T-ОЛЛ	66°_30cl s
IgK	mixS	VkI - Jk	VkI-5' : Jk1-4R + Jk5_R	280-295	B-ОЛЛ	64°_35cl s
	mixT	VkII - Jk	VkII-5' : Jk1-4R + Jk5_R	280-295	B-ОЛЛ	64°_35cl s
	mixU	VkIII - Jk	VkIII-5' : Jk1-4R + Jk5_R	280-295	B-ОЛЛ	64°_35cl s

	mixW	VkI - KDE	VkI-5' : KDE-3'	420-450	В-ОЛЛ	64°_35cl s
	mixX	VkII - KDE	VkII-5' : KDE-3'	420-450	В-ОЛЛ	64°_35cl s
	mixY	VkIII, IV - KDE	VkIII-5' + VkIV-5' : KDE-3'	420-450	В-ОЛЛ	64°_35cl s
TCRB	TCRB_A	Vβ: Jβ	23 Vβ Primers : 9 Jβ(B) Primers	350-370	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cl s
	TCRB_B	Vβ: Jβ	23 Vβ Primers: 4 Jβ (A)Primers	350-370	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cl s
	TCRB_C	Dβ: Jβ	2 Dβ Primers: 13 (9+4) Jβ Primers	350-370	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cl s

ПЦР-реакцию проводят в объеме 30 мкл, содержащую 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТП, 12,5 пмоль каждого из праймеров и 0,5 ЕД термостабильной ДНК-полимеразы. В реакцию вносят диагностическую ДНК в количестве 100 нг.

Циклический температурный режим реакции:

60°_35cls

95 °C – 1 мин
95 °C – 30 с
60 °C – 30 с
72 °C – 1 мин
72 °C – 5 мин
4 °C – пауза

} 35 циклов

66°_30cls

95 °C – 1 мин
95 °C – 30 с
66 °C – 30 с
72 °C – 1 мин
72 °C – 5 мин
4 °C – пауза

} 30 циклов

64°_35cls

95 °C – 1 мин
95 °C – 30 с
64 °C – 30 с
72 °C – 1 мин
72 °C – 5 мин
4 °C – пауза

} 35 циклов

Электрофорез в агарозном геле

Для визуализации продуктов ПЦР-амплификации используют электрофорез в 1,5 % агарозном геле, окрашенный бромистым этидием, в камере с солевым буфером при постоянном напряжении тока 150–160 В. Пример визуализации амплификации представлен на рисунке 1 (сверху указаны условные названия реаранжировок согласно таблице 4; красным выделен положительный результат (ПЦР-продукт ожидаемого размера)).

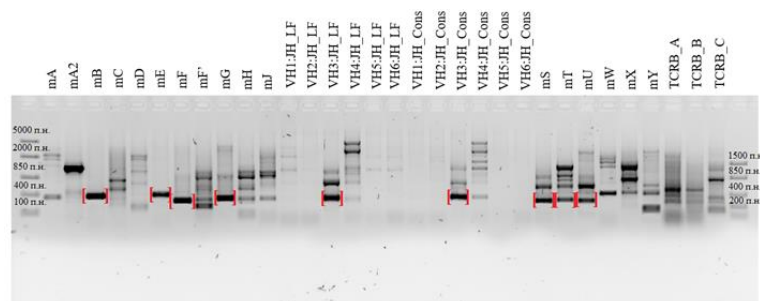


Рисунок 1. — Визуализация амплификации в агарозном геле

Идентификация моноклональных и поликлональных ПЦР-продуктов

Для идентификации моно- и поликлональных ПЦР-продуктов проводят гетеродуплексный анализ в 8–10 % полиакриламидном геле на аппарате для вертикального электрофореза с 0,5xTBE буфером.

Для приготовления геля в пробирку объемом 50 мл добавляют: 21 мл деионизированной воды; 3 мл 5-кратного солевого буфера; 6 мл 40 % акриламид/бис-акриламид (39:1); 0,4 мл 1 % персульфата аммония; 40 мкл TEMED, после чего полученный раствор тщательно перемешивают и незамедлительно заливают между стеклянными пластинами и сразу же вставляют чистую гребенку в раствор концентрирующего геля так, чтобы избежать попадания в гель воздушных пузырей и оставляют высыхать минимум на 2 ч.

Перед запуском аппарата для вертикального электрофореза ПЦР-продукты прогревают в течение 5 мин при 95 °С с последующим медленным охлаждением по градиенту до 4 °С и инкубируют в течение 30 мин для образования гетеродуплексов.

Электрофорез проводят в течение 3 ч 20 мин при силе тока 150 мА и постепенным поднятием напряжения:

Напряжение	50 В	100 В	150 В	200 В	250 В	300 В
Время	10 мин	10 мин	10 мин	10 мин	10 мин	2,5 ч

После завершения программы гель окрашивают 0,1 % раствором бромистого этидия в течение 10 мин в темноте и переносят в документирующую систему для визуализации и сохранения данных. Затем из геля вырезают полосы ДНК подходящего размера и помещают в пробирки объемом 0,5 мл. К вырезанным фрагментам добавляют 100 мкл ТЭ-буфера и инкубируют при комнатной температуре минимум 10 ч.

В результате гетеродуплексного анализа моноклональные ПЦР-продукты сохраняются в виде фрагментов ДНК соответствующего размера (гомодуплексы), а фрагменты поликлонального происхождения образуют полосы более медленно движущихся в геле фрагментов ДНК, обычно образующих характерный мазок. Пример представлен на рисунке 2.

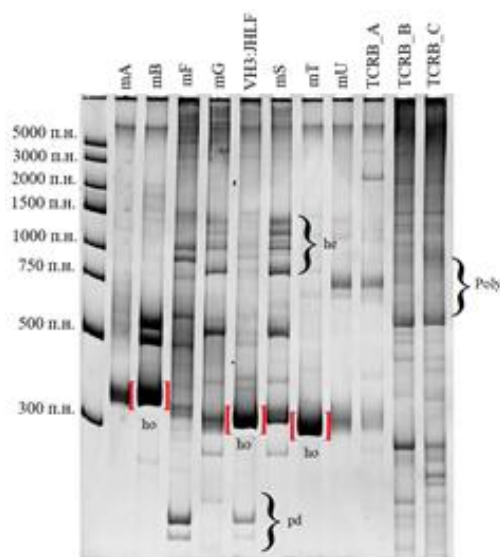


Рисунок 2. — Визуализация гетеродуплексного анализа в полиакриламидном геле

Сверху указаны условные названия мишеней (тип реаранжировок) согласно таблице 4.

В рамке отмечены гомодуплексы в диапазоне 300-400 п.н.

Обозначения: he — гетеродуплексы; ho — гомодуплексы; poly — мазок гетеродуплексов, характерный для поликлональной реаранжировки; pd — праймеры и праймер-димеры.

Секвенирование и определение последовательности для идентификации реаранжировок генов Ig\TCR

ПЦР-продукты, растворенные из геля, подвергают ДНК-секвенированию с той же парой праймеров, что использовались для амплификации в данной конкретной реакции.

Первичную обработку полученных результатов осуществляют путем выравнивание прямой и обратной последовательности каждого фрагмента с целью их сопоставления и определения последовательности.

После получения выверенной последовательности секвенированного фрагмента ее анализируют на предмет идентификации V(D)J- генных сегментов и анализа соединительного региона.

Подбор аллель-специфических олигонуклеотидов

Аллель-специфические олигонуклеотиды подбирают вручную к уникальному соединительному региону перестроенных генов Ig/TCR на стыке V- (D) J-генных сегментов. Праймер подбирают в прямой ориентации относительно V(D)J региона, или в обратной, в зависимости от типа реаранжировки и комбинации со вторым (консенсусным) праймером и зондом согласно таблице 6.

Аллель-специфические олигонуклеотиды подбирается длиной 18–25 нуклеотидов, с расчетной температурой отжига 58–63 °С и содержанием GC нуклеотидов в интервале 40–60 %, так же АСО-праймер должен перекрывать область соединительного региона (N-нуклеотидов).

Впоследствии АСО используют как пациент-специфические праймеры в измерении остаточных опухолевых клеток методом ПЦР в режиме реального времени.

Таблица 6. — Комбинации АСО-праймера, консенсусного праймера и флуоресцентного зонда (пробы) для ПЦР в режиме реального времени

Міх (условное обозначение)	Реаранжировка	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд
Для гена TCRD				
mixA	Vδ1-Jδ1	ASO_F	Jd1R	Jd1TM
mixA2	Vδ2-Jδ1	ASO_F	Jd1R	Jd1TM
mixB	Vδ2-Dδ3	Vd2F	ASO_R	Vd2TM
		ASO_F	Dd3R	Dd3TM
mixC	Dδ2-Dδ3	ASO_F	Dd3R	Dd3TM
mixD	Dδ2-Jδ1	ASO_F	Jd1R	Jd1TM
mixE	Vδ2-Jα9, Jα24	Vd2F	ASO_R	Vd2TM
Для гена TCRG				
mixF	VγI - Jγ1.1/2.1	ASO_F	JPg1/2R	JPg1/2TM
mixF''	VγII,III,IV-1.1/2.1	ASO_F	JPg1/2R	JPg1/2TM
mixG	VγI - Jγ1.3/2.3	ASO_F	Jg1/2R	Jg1/2TM
mixH	VγII - Jγ1.3/2.3	ASO_F	Jg1/2R	Jg1/2TM
mixJ	VγIII,I- Jγ1.3/2.3	ASO_F	Jg1/2R	Jg1/2TM
Для гена IgH				
VH1-6	VH - JH	ASO_F	R-JH1-intron	T-JH1.2.4.5
VH1-6	VH - JH	ASO_F	R-JH2-intron	T-JH1.2.4.5
VH1-6	VH - JH	ASO_F	R-JH3-intron	T-JH3
VH1-6	VH - JH	ASO_F	R-JH4-intron	T-JH1.2.4.5
VH1-6	VH - JH	ASO_F	R-JH5-intron	T-JH1.2.4.5
VH1-6	VH - JH	ASO_F	R-JH6-intron	T-JH6
Для гена IgK				
mixS	VkI - Jk	ASO_F	IGKJ1,2,3,4,5_R	IGKJ1,2,3,4,5_TM
mixT	VkII - Jk	ASO_F	IGKJ1,2,3,4,5_R	IGKJ1,2,3,4,5_TM
mixU	VkIII - Jk	ASO_F	IGKJ1,2,3,4,5_R	IGKJ1,2,3,4,5_TM
mixW	VkI - KDE	ASO_F	kdeR	kdeTM
mixX	VkII - KDE	ASO_F	kdeR	kdeTM
mixY	VkIII, IV - KDE	ASO_F	kdeR	kdeTM
Для гена TCRB				
TCRb_A	Vβ - Jβ	ASO_F	R-Jb1.1	TM-Jb1.1
		ASO_F	R-Jb1.2	TM-Jb1.2
		ASO_F	R-Jb1.3	TM-Jb1.3
		ASO_F	R-Jb1.4	TM-Jb1.4
		ASO_F	R-Jb1.5	TM-Jb1.5

		ASO_F	R-Jb1.6	TM-Jb1.6
		ASO_F	R-Jb2.2	TM-Jb2.2
		ASO_F	R-Jb2.6	TM-Jb2.6
		ASO_F	R-Jb2.7	TM-Jb2.7
TCRb_V	Vb - Jb	ASO_F	R-Jb2.1	TM-Jb2.1
		ASO_F	R-Jb2.3	TM-Jb2.3
		ASO_F	R-Jb2.4	TM-Jb2.4
		ASO_F	R-Jb2.5	TM-Jb2.5
TCRb_C	Db- Jb	ASO_F	(один из всех выше)	(один из всех выше)

Примечания:

ASO_F — АСО праймер в «прямой» ориентации в паре с обратным консенсусным;

ASO_K — АСО праймер в «обратной» ориентации в паре с прямым консенсусным.

Для реаранжировок генов IgH, IgK, TCRb обратный праймер и проба выбираются согласно с результатом секвенирования J-сегмента.

Этап 3. Измерение остаточных опухолевых клеток

Проверка специфичности аллель-специфических олигонуклеотидов

После подбора аллель-специфических олигонуклеотидов, проводят тестовую ПЦР в режиме реального времени для проверки специфичности. Основной праймер и флуоресцентная проба подбираются для каждой реаранжировки согласно таблицы 6. Последовательности праймеров и зондов приведены в таблице 2 для реаранжировок и в таблице 3 для контрольных генов.

Для постановки тестовой ПЦР в режиме реального времени используют 2-кратную реакционную смесь, не содержащую референсных красителей, воду и раствор смеси праймеров. Каждая реакция проводится в объеме 20 мкл включая 500 нг каждого праймера, 150 нг флуоресцентной пробы и 500 нг геномной ДНК.

Постановка количественного ПЦР в режиме реального времени для измерения остаточных опухолевых клеток

Постановка ПЦР в режиме реального времени требует калибровку, получаемую путем серийных разведений диагностической ДНК и построения калибровочной кривой.

Полимеразную цепную реакцию для определения остаточных опухолевых клеток проводят аналогично тестированию АСО. Параллельно готовят две общие смеси с праймерами и пробой – для диагностируемой ДНК с АСО-праймером и для контрольного гена.

Полученную смесь раскапывают в заранее запланированную плашку по 15 мкл, после чего в них вносится ДНК по 5 мкл. Диагностическая ДНК вносится в дуплетах, анализируемые образцы – в триплетах, поликлональная ДНК — в 6 повторах.

Измерение остаточных опухолевых клеток

Для точного измерения остаточных опухолевых клеток проводят калибровку по серийным разведениям диагностической ДНК.

Каждая калибровка количественно характеризуется следующими параметрами:

1. Slope (наклон) или угловой коэффициент. Численно равен $\Delta Ct/\Delta SQ$ или тангенсу угла наклона стандартной кривой по отношению к оси абсцисс. В десятичной логарифмической шкале SQ составляет 3,3. Калибровка считается приемлемой для расчета ООК, если угловой коэффициент находится в пределах 3,1–3,9 SQ.

2. Коэффициент корреляции (R). Рассчитывается как коэффициент Пирсона между разными разведениями и составляет 1 — это указывает, что шаг разведений в точности равен смещению точки Ct. Калибровка считается приемлемой для расчета ООК, если коэффициент корреляции находится в пределах 0,98–1 Ct.

3. Эффективность ПЦР указывает на количество ПЦР-продукта относительно теоретически рассчитанного в процентах. Калибровка считается приемлемой для расчета ООК, если эффективность находится в пределах 90–110 %.

4. Интерсепт (intercept) — точка пересечения стандартной прямой оси ординат, количественно выражается в значении Ct нулевого уровня разведения.

Для количественной оценки остаточных опухолевых клеток используют метод стандартной кривой, которая позволяет на основании экспериментальной модели пересчитать уровень амплификации (Ct) измеряемого образца в значение стандартного количества (SQ), которое выражается количество в логарифмическом виде относительно диагностической ДНК принятого за 1.

Окончательный уровень остаточных опухолевых клеток рассчитывают исходя из нормализации по контрольному гену по формулам 1–3:

$$\text{Поправочный коэффициент}(K ref) = \frac{\text{Стандартное количество ДНК (SQ)(follow up)}}{\text{Стандартное количество ДНК (SQ)(D-DNA)}}, \quad (1)$$

$$\text{Снижение мишени} = \frac{\text{Стандартное количество мишени (SQ)(follow up)}}{\text{Стандартное количество мишени (SQ)(D-DNA)}}, \quad (2)$$

$$\text{Нормализованное снижение мишени} = \frac{K ref (follow up)}{\text{Снижение мишени (follow up)}}. \quad (3)$$

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибка	Причина	Решение
Из пунктата костного мозга не выделяется ДНК достаточно хорошего качества	Костный мозг набран в пробирку с неподходящим консервантом, слишком долго хранился при положительной температуре	Пунктат костного мозга набирать в пробирку с консервантом ЭДТА и немедленно доставлять в лабораторию
Не удается идентифицировать последовательность генов после секвенирования образцов	После гетеродуплексного анализа образовались очень тонкие полосы ДНК или при исходной ПЦР использовалась мультиплексование (более одной пары праймеров)	При синглплексных реакциях произвести реамплификацию растворенных фрагментов с той же парой праймеров, что использовались на первом шаге амплификации. Если использовалась мультиплексная ПЦР, то необходимо разделить на две и более синглплексные реакции
Не удается идентифицировать клональные реаранжировки генов	Малое количество опухолевых клеток в образце	Использовать гистологически/морфологически подтвержденный материал. Измерить количество опухолевых клеток в образце методом проточной цитометрии
При проверке АСО-праймеров методом ПЦР в режиме реального времени не наблюдается полная специфичность	Неправильно подобрана температура отжига праймеров	Подобрать температуру отжига для каждого АСО-праймера, изменяя ее от 55 до 68 °С