

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

2012 г.

Регистрационный № 130-1012



**Метод ПЦР-диагностики
для комплексного определения молекулярно-генетических изменений у
детей с острыми лейкозами
инструкция по применению**

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

К.б.н. Кустанович А.М.

М.н.с. Романцова А.С.

Д.м.н., профессор, член.корр.НАН РБ Алейникова О.В.

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

20.12.2012

Регистрационный № 130-1012

**МЕТОД ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ
У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.М. Кустанович, мл. науч. сотр. А.С. Романцова, д-р
мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2012

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Термоциклер
Центрифуги с охлаждением на 14000 об./мин
ПЦР бокс
Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле
Варипипетки (дозаторы)
Вортекс
Документирующая система
Магнитная мешалка с подогревом
Морозильник -20°C / Морозильник -70°C
Спектрофотометр
Термомиксер
Тaq-полимераза
Агароза
Вода деионизованная
Маркер молекулярного веса
Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ)
Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем — 0,1–1000 мкл) и пробирки (объем — 0,2–50 мл)
Праймеры и пробы

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют. Осложнений не наблюдается.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

ПЦР является методом выбора для оценки экспрессии химерных генов из-за его чувствительности и специфичности, а также возможности выявлять криптические субмикроскопические изменения. В основу методики положена двухстадийная (гнездная) мультиплексная ПЦР с обратной транскрипцией (рис. 1).

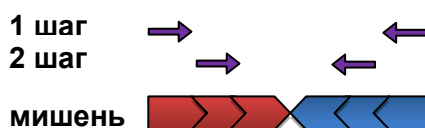


Рис. 1 — Схема расположения праймеров при проведении гнездной ПЦР

Мультиплексная ПЦР позволяет объединить в одной реакции определение нескольких мишеней, что приводит к экономии времени, реактивов и актуально при недостатке материала от пациентов. В то же время использование мультиплексной ПЦР, как отмечается практически во всех руководствах,

рассматривающих данный подход, требует тщательной оптимизации как концентраций всех компонентов, так и условий проведения реакции.

Алгоритм проведения ПЦР-диагностики для комплексного определения молекулярно-генетических изменений при острых лейкозах

На момент постановки диагноза проводится первичный скрининг образцов костного мозга пациентов с острым лейкозом для выявления молекулярных маркеров опухолевых клеток (химерных генов). Для определения химерных генов используется шесть реакций (табл. 1). При этом, если лейкоз бифенотипический или его линейность неизвестна, целесообразна постановка всех шести реакций. В случае острого лимфобластного лейкоза можно ограничиться реакциями № 1, 4, 5, 6, при остром миелоидном лейкозе — реакциями № 2, 3, 4, 5, 6.

В случае появления характерной полосы в геле проводится дополнительный анализ для определения конкретного химерного гена с использованием сингплексной ПЦР на те гены, праймеры к которым входят в состав мультиплексной ПЦР. Отсутствие полосы, соответствующей контрольному гену, свидетельствует о недостаточном количестве/низком качестве кДНК для данной конкретной реакции.

Таблица 1 — Мультиплексные реакции (МП), используемые для определения экспрессии химерных онкогенов при острых лейкозах

	1 реакция (L)*	2 реакция (A1)	3 реакция (A2)	4 реакция (M1)	5 реакция (M2)	6 реакция (B)
	ABL**	ABL	ABL	ABL	ABL	ABL
A	TEL-AML1	PML-RARA	PML-RARA	MLL-AF4	MLL-AF4	BCR-ABL ^{p190}
B	E2A-PBX1	NPM-RARA	AML1-ETO	MLL-AF6	MLL-AF6	BCR-ABL ^{p210}
C	E2A-HLF	PLZF-RARA	DEC-CAN	MLL-AF9	MLL-AF9	NUP-ABL
D	SIL-TAL1	CBFB-MYH11	CBFB-MYH11	MLL-AF10	MLL-AF10	
E				MLL-ENL	MLL-ENL	
F				MLL-ELL	MLL-ELL	
G				CALM-AF10	CALM-AF10	

Примечание — *условное обозначение реакции. Слева в колонке представлены номера сингплексных реакций; **контрольный ген, включенный в каждую реакцию.

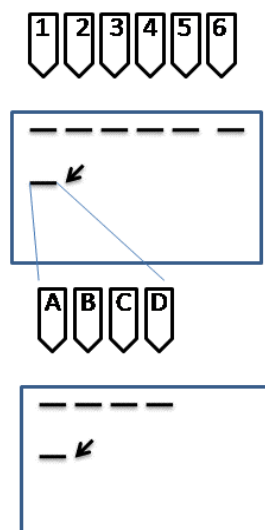


Рис. 2 — Схема анализа экспрессии химерных генов у пациентов с ОЛЛ

В схеме, представленной на рис. 1 сверху, на агарозном геле были проанализированы ПЦР продукты 6 мультиплексных реакций. В первой было выявлено появление дополнительной полосы (указана стрелкой), что потребовало проведения синглексной реакции на гены А-Д (четыре пробирки в нижней части рисунка 1). Анализ ПЦР показал, что в исследуемом образце присутствует экспрессия гена А. С использованием данного метода это означало бы наличие у исследуемого пациента экспрессии гена TEL-AML1 (табл. 1).

Мультиплексная Полимеразная Цепная Реакция

ВНИМАНИЕ! Качество полученной кДНК является критичным параметром для выполнения методики. Смеси для ПЦР необходимо разделить на аликвоты и хранить при температуре не выше -18°C . Все процедуры выполнять на льду.

Состав реакционной смеси готовится в соответствии с прописью, указанной в табл. 2. Реакционную смесь инкубируют 2 мин при 95°C , 1 мин при 97°C , затем проводят 25 циклов ПЦР (95°C — 15 с, 58°C — 20 с, 72°C — 30 с), окончательная элонгация продуктов ПЦР — 5 мин при 72°C . Условия проведения ПЦР для первого и второго шага сходны, во второй шаг ПЦР вносят 1 мкл ПЦР продукта первого шага.

Электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле

10 мкл продуктов ПЦР смешивают с 2 мкл бромфенолового синего и вносят в лунки 1,5% агарозного геля, содержащего этидиум бромид. Электрофорез проходит в течение 45 мин при напряжении 150 В и силе тока 150 мА в аппарате для горизонтального электрофореза.

Таблица 2 — Состав реакционной смеси для проведения гнездовой мультиплексной ПЦР

	1 шаг (мкл)	2 шаг (мкл)
5x ПЦР буфер	5,5	5,0
25 mM MgCl ₂	1,65	1,5

25 мМ dНТФ	0,2	0,2
Taq ДНК Полимераза (5 ед/мкл)	0,15	0,15
Смесь праймеров*	1	1
Вода	12,5–14,5	16,15
кДНК/ПЦР продукт первого шага	2–4**	1
Итого	25	25

Примечание — *праймеры можно получить в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» безвозмездно; **2–4 мкл (соответствует 40–80 нг РНК).

Схема анализа

1. Разморозить на льду пробирки первого шага (4 для ОЛЛ — реакции L, B, M1, M2; 5 для ОМЛ — B, M1, M2, A1, A2; 1 — B для ХМЛ, все 6 реакций в случае неопределенной линейной принадлежности лейкоза для каждого анализируемого образца).

2. Внести по 2 мкл кДНК в реакционные пробирки.

3. Осадить содержимое пробирок с реакцией первого шага и кДНК. Поместить на лед.

4. Поставить реакции в термоциклер, когда температура блока достигнет 85°C. По завершению ПЦР извлечь пробирки из термоциклера.

5. Разморозить на льду пробирки второго шага (4 для ОЛЛ — реакции L, B, M1, M2, 5 для ОМЛ — B, M1, M2, A1, A2; 1 — B для ХМЛ, все 6 реакций в случае неопределенной линейной принадлежности лейкоза) с зеленым содержимым.

6. Внести по 1 мкл реакции первого шага в реакционные пробирки второго шага.

7. Осадить содержимое пробирок с реакцией первого шага. Поместить на лед.

8. Поставить реакции в термоциклер, когда температура блока достигнет 85°C.

9. Внести по 5–10 мкл ПЦР продукта второго шага в 1,5% агарозный гель. Через 30–40 мин проанализировать результаты анализа.