

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

«*10*» *августа* 2018 г.

Регистрационный № 133-1118



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК ТРЕС И
КРЕС ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО
ВОЗРАСТА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

Стёганцева М.В., Полякова Е.А., Гурьянова И.Е., Сакович И.С., к.б.н.
Шарапова С.О., Алешкевич С.Н., Жаранкова Ю.С., к.м.н. Минаковская
Н.В., к.б.н. Белевцев М.В., д.м.н, профессор, член-корр. НАН Беларуси
Алейникова О.В.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
30.11.2018
Регистрационный № 133-1118

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК ТРЕС И КРЕС
ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ
СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: М. В. Стеганцева, Е. А. Полякова, И. Е. Гурьянова, И. С. Сакович, канд. биол. наук С. О. Шарапова, С. Н. Алешкевич, Ю. С. Жаранкова, канд. мед. наук Н. В. Минаковская, канд. биол. наук М. В. Белевцев, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси О. В. Алейникова

Минск 2018

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП	— баз пар
BCR	— В-клеточный рецептор (B-cell receptor)
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
КМ	— костный мозг
ПК	— периферическая кровь
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
TCR	— Т-клеточный рецептор (T-cell receptor)
Taq-ДНК- полимераза	— термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза
ФСБ	— фосфатно-солевой буфер (PBS)
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота
TREC	— эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора (T-cell receptor excision circles)
KREC	— эксцизионное кольцо рекомбинации к-цепи (kappa-deleting recombination excision circles)
RSS	— сигнальная последовательность рекомбинации (Recombination signal sequence)
RCLB	— буфер, лизирующий эритроциты (Red cell lysis buffer)
Taq- полимераза	— термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения кольцевых молекул ДНК TREC и KREC для оценки функционального состояния иммунной системы пациентов детского возраста.

Анализ количественного определения молекул TREC и KREC позволяет идентифицировать наивные Т- и В-клетки, покинувшие тимус и костный мозг, и может рассматриваться в качестве лабораторного метода первой линии идентификации иммунодефицитных состояний

Инструкция предназначена для использования в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику болезней крови, кроветворных органов и отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм (МКБ-10), а также для врачей лабораторной диагностики, врачей-гематологов, врачей-онкологов, врачей-иммунологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с врожденными и химиоиндуцированными нарушениями иммунной системы в стационарных и амбулаторных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле и источник тока

Аппарат для вертикального электрофореза и источник тока

Микроволновая печь

Стеклянная посуда

Весы для взвешивания навесок

Ультрафиолетовый трансиллюминатор (длина волны 312 нм)

Мешалка-Вортекс

Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл

Плашки для проведения ПЦР в режиме реального времени

Оптические крышки для проведения ПЦР в режиме реального времени

Стрипы объемом 0,2 мкл

Эппендорфы от 0,2 мкл до 1,5 мл

Пробирки объемом 15 мл

Прибор для электропорации

Кюветы для электропорации

Шпатели

Чашки Петри

Скальпель

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза

Морозильник -20 °С

Спектрофотометр

Термомиксер

Термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени

Центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза

Реактивы

Тақ-ДНК-полимераза
Агароза
Бромистый этидиум
ДНК-маркеры
Вода деионизированная
Изопропанол
Ацетат аммония 8М
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)
Лизирующий буфер (DB)
Флуоресцентно-меченные праймеры для амплификации генов альбумина TREC, KREC
2х мастер микс для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)
Фосфатно-солевой буфер (рН 7,2-7,4)
Этанол, 70 %
Этанол, 96 %
Акриламид/бис-акриламид (39:1)
Персульфат аммония
Temed — компонент, необходимый для полимеризации полиакриламидного геля
Трис-борат-ЭДТА (ТВЕ) буфер
S-Gal среда — хромогенный субстрат, содержащий β-галактозидазу
LB агар (Luria broth) — лизогенная богатая среда для роста культур бактерий

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Врожденные и химиоиндуцированные нарушения иммунной системы

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Подбор праймеров для амплификации и клонирования
2. ПЦР амплификация генов и оптимизация условий ПЦР
3. Клонирование генов TREC, KREC и контрольного гена ALB
 - 3.1. Очистка ПЦР-продукта
 - 3.2. Измерение концентрации полученного продукта
 - 3.3. Лигирование очищенных ПЦР продуктов с плазмидным вектором
 - 3.4. Трансформация
 - 3.5. Культивирование клеток
 - 3.6. Проверка специфичности
 - 3.7. Секвенирование выделенных плазмид и проверка их аутентичности

- 3.8. Выделение плазмид из культивируемой культуры
- 3.9. Рестрикция плазмид
- 3.10. Определение концентрации плазмид и количества копий
- 3.11. Серийные разведения плазмидной ДНК
- 4. Подготовка материала для исследования. Выделение ДНК из мононуклеаров периферической крови, костного мозга, «сухих пятен» крови
 - 4.1. Растворение и измерение концентрации полученной ДНК
- 5. Определение количества копий TREC и KREC методом ПЦР в реальном времени

6. Анализ результатов

Подбор праймеров для амплификации и клонирования

В качестве внутреннего контроля для нормализации экспрессии был выбран альбумин (ALB). Праймеры амплифицируют участок внутри гена в 12 экзоне.

Таблица 1. — Праймеры для ПЦР амплификации гена-ALB

Название	Последовательность 5'-3'	Размер
ALB_Forward	TGAACAGGCGACCATGCTT	19
ALB_Reverse	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT	26
ALB_Probe	TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA	27

Размер продукта 118 нуклеотидов.

Прямой и обратный праймеры предназначены для амплификации продукта с последующим его клонированием в плазмидный вектор. Все три праймера вместе с пробой будут использованы для оценки количества копий гена в реакции ПЦР в реальном времени.

Особенность подбора праймеров для sjTREC заключалась в том, что локус δ-цепи TCR, который подвергается делеции, располагается внутри генов α-цепи на 14 хромосоме (рисунок 1). Геномные координаты (GRCh38): [14:22,462,931-22,466,576](#).

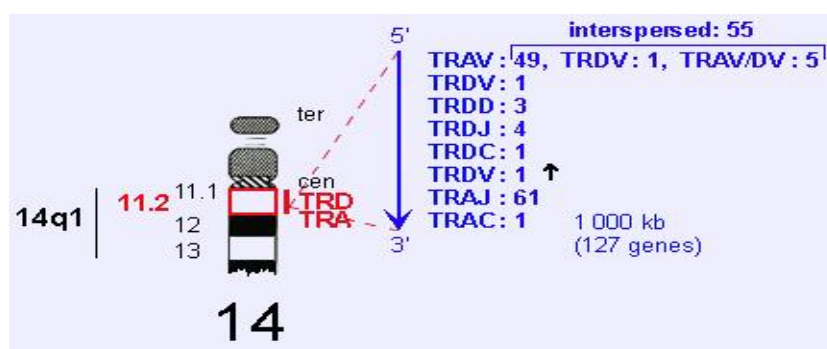


Рисунок 1. — Карта расположения генов α и δ-цепей ТКР (*GeneAtlas*)

В связи с этим праймеры подбирали на участок соединения линейного фрагмента δ-цепи TCR, по краям которого располагаются делетирующие последовательности δRes и ΨJα (рисунок 2). В геномной ДНК расстояние между этими участками составляет более 88000 нуклеотидов. Однако в кольцевой

молекуле sjTREC данные сегменты соединяются, в результате чего становится возможной амплификация кольцевой молекулы.

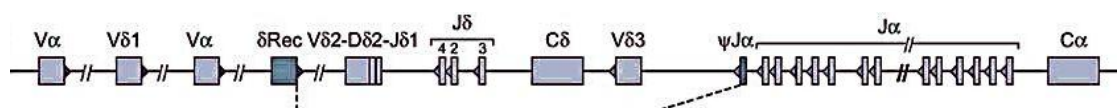


Рисунок 2. — Расположение генных сегментов α и δ -цепи. Первая реарранжировка проходит на границе делетирующих сегментов δ -цепи δ Rec и Ψ J α

Таблица 2. — Праймеры для ПЦР амплификации кольцевой молекулы ДНК sjTREC (NC_000014.9)

Название	Последовательность 5'-3'	Размер
sjTREC_Forward	CCATGCTGACACCTCTGGTT	21
sjTREC_Reverse	CTTCATTCACCGTTCTCACGA	21
sjTREC_Probe	CACGGTGATGCATAGGCACCTGC	23

Размер продукта 197 нуклеотидов. Прямой праймер располагается в последовательности Ψ J α , а обратный праймер и проба — в участке, кодирующем δ Rec.

Подбор праймеров для sjKREC сходен с таковым для TCR. Расположение локусов к-цепи иммуноглобулина показано на рисунке 3. Праймеры подбирают на делетирующие фрагменты к-цепи IGK.

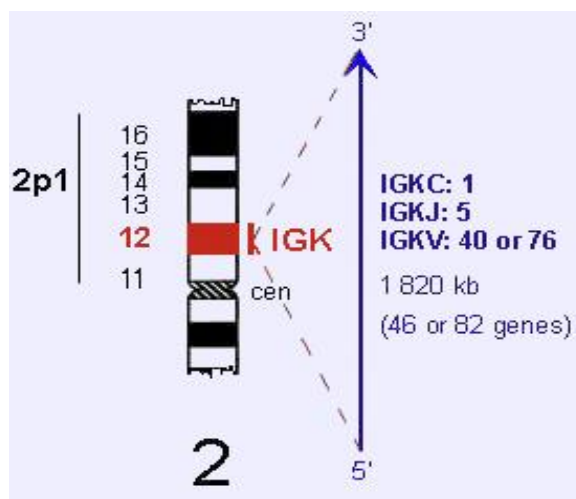


Рисунок 3. — Карта расположения генных сегментов IGK

В геномной ДНК расстояние между данными фрагментами составляет около 100000 нуклеотидов, однако после рекомбинации IGKDEL с фрагментом RSS они сближаются, и размер амплифицируемого фрагмента составляет 148 нуклеотидов.

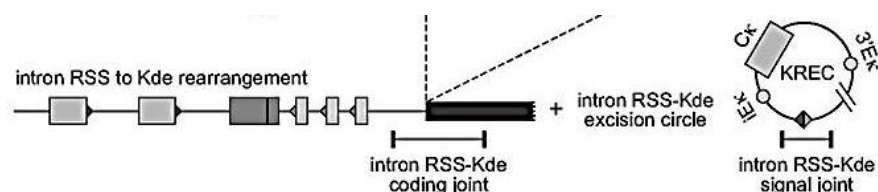


Рисунок 4. — Расположение генных сегментов и регуляторных последовательностей IGK

Таблица 3. — Праймеры для ПЦР-амплификации кольцевой молекулы ДНК sjKREC (NC_018913.2)

Название	Последовательность 5'-3'	Размер
sjKREC_Forward	TCAGCGCCCATACGTTTCT	20
sjKREC_Reverse	GTGAGGGACACGCAGCC	17
sjKREC_Probe	CCAGTCTTACCCTAGAGTTTCTGCACG	29

Оптимизация условий ПЦР

Полимеразную цепную реакцию проводят с использованием геномной ДНК. Для амплификации генов используют прямой и обратный праймеры, приведенные выше. ПЦР-реакцию проводят в объеме 25 мкл и включающем 5 мкл 5xBuffer (Promega Corporation, США), 0,2 мкл 25 mM dNTP, 1,5 мкл 25 mM MgCl₂ (Promega Corporation, США), 0,15 мкл 5U TaqPol, по 0,125 мкл праймеров F/R 100p Mol (Праймтех, Беларусь), 15,9 мкл H₂O либо реагентами других производителей. С целью оптимизации реакции выбирают температурный градиент отжига праймеров в диапазоне от 58 до 62 °C. Условия ПЦР следующие:

95 °C — 10 мин

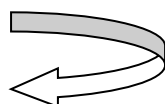
95 °C — 15 с

58–62 °C — 20 с

72 °C — 30 с

72 °C — 5 мин

4 °C — ∞



35 циклов

Эффективность ПЦР оценивают методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. В лунки агарозного геля, содержащего бромистый этидиум, вносят 10 мкл продукта ПЦР. Электрофорез проходит в течение 45 мин при напряжении 150 В и силе тока 150 мА в аппарате для горизонтального электрофореза.

По результатам электрофореза определяют наиболее оптимальную температуру отжига, в данном случае она составляет 60 °C.

Клонирование генов TREC, KREC и контрольного гена ALB

Для количественной оценки копий кольцевых молекул TREC, KREC и контрольного гена ALB необходимо создание плазмидных стандартов с четко установленным количеством молекул в 1 мкл. Для выполнения данной задачи производят клонирование амплифицированных фрагментов TREC, KREC и ALB в плазмидный вектор pTZ57R/T или любой другой коммерчески доступный вектор. Процесс клонирования включает несколько этапов.

Очистка ПЦР-продукта

ПЦР продукты для лигирования предварительно очищают в 8 %-м полиакриламидном геле. Компоненты, необходимые для приготовления геля, изложены в таблице 4.

Таблица 4. — Приготовление 8 %-го полиакриламидного геля для чистки

Реагенты	Количество
40 % Акриламид/бисакриламид (39:1)	6 мл
5x Трис-борат-ЭДТА (ТВЕ) буфер	3 мл
Персульфат аммония	400 мкл
Temed	40 мкл
Вода	До 30 (25,56) мл

После добавления темеда и персульфата аммония все тщательно перемешивают и в течение 3 мин заливают гель в заранее собранные стекла со спейсерами. Погружают в гель гребенки для формирования лунок. Оставляют гель полимеризоваться на 1–2 ч. После полимеризации лунки промывают 0,5-кратным раствором ТВЕ. В первую лунку вносят маркер молекулярного веса для ПЦР. Амплифицированные образцы в полном объеме вносят в лунки. Стекла с внесенными образцами погружают в камеру для вертикального электрофореза, подключают к источнику тока и запускают программу, выставляя градиент напряжения:

- 50 В — 10 мин
- 100 В — 10 мин
- 150 В — 10 мин
- 250 В — 10 мин
- 300 В — часа

После окончания программы электрофореза стекла разбирают и гель окрашивают в 0,5-кратном растворе бромистого этидиума в течение 5–10 мин. Затем переключают на детектирующую камеру.

Размеры определяют путем сравнения наборов коммерческих фрагментов ДНК известной длины (например, «O'Gene Ruler DNA ladder») и ДНК в проверяемых образцах. После этого вырезают нужный фрагмент из геля и в зависимости от интенсивности свечения добавляют в эппендорф 60–100 мкл деионизированной воды, оставив элюироваться на ночь.

Измерение концентрации полученного продукта

Концентрацию вставки измеряют методом электрофореза в 2 % агарозном геле с использованием маркера для ПЦР.

В лунки агарозного геля, содержащего бромистый этидиум, вносят 5 мкл продукта ПЦР. Электрофорез проводят в течение 45 мин при напряжении 150 В и силе тока 150 мА в аппарате для горизонтального электрофореза. Затем переключают гель на детектирующую камеру и при помощи программы и заведомо известного молекулярного веса маркера считают концентрацию продукта.

Лигирование очищенных ПЦР продуктов с плазмидным вектором

Лигирование проводят с использованием набора Rapid DNA Ligation&Transformation Kit (Fermentas) согласно прилагаемой инструкции. В качестве вектора используют плазмиду pTZ57R/T. Соединение ДНК-вставки с вектором осуществляют по ТА-концам. Соотношение концентраций вставка/вектор определяют с помощью программы «Ligation Calculator». Реакция лигирования протекает ночь при 4 °С.

Трансформация

Трансформацию проводят с использованием CaCl₂. В качестве компетентных клеток используют штамм XL1-Blue бактерии *E. coli*. Компетентные клетки получают кальций-холодовым методом по Т. Maniatis. В 5 мл бульона LB вносят отдельную колонию клеток *E. coli*. Флакон помещают на шейкер и инкубируют при 37 °С в течение 3 ч. В стерильные эппендорфы вносят полученную культуру клеток по 1,5 мл, охлаждают до 4 °С и центрифугируют 10 мин при 4 °С (3000 об/мин), осадок ресуспендируют в 500 мкл 0,1М CaCl₂. Образцы помещают на 4 °С на 40 мин с последующим центрифугированием 10 мин при 4 °С (3000 об/мин). Полученный осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,1 М CaCl₂.

В 100 мкл суспензии клеток вносят 100 нг плазмидной ДНК, выдерживают 30 мин при 4 °С, производят тепловой шок при 42 °С в течение 90 с, быстро охлаждают на льду в течение 2 мин, после чего добавляют бульон LB до конечного объема 1 мл и помещают в термостат на 1 ч. Бактериальную суспензию наносят по 150 мкл на чашку Петри и рассеивают «газоном» с помощью шпателя.

Для селекции трансформированных клонов используют ампициллин, а также специфическую среду S-Gal, содержащую субстрат, при расщеплении которого колонии окрашиваются в черный цвет в случае, когда Lac оперон плазмиды остается не поврежденным. Если же колонии становятся белыми, значит легирование встраиваемого ДНК фрагмента и вектора прошло успешно, так как Lac оперон плазмиды является сайтом встраивания участка гена. После трансформации клетки культивируют 18 ч в термостате при 37 °С.

Проверка специфичности

С каждой чашки Петри выбирают по 5 колоний и проверяют их специфичность при помощи ПЦР.

Секвенирование плазмид и проверка их аутентичности

Плазмиды, выделенные из трансформированной культуры *E. coli*, секвенируют и определяют их аутентичность.

Для секвенирования необходимы:

Флуоресцентно-меченные нуклеотиды (Big Dye) — 1 мкл

5x Buffer для секвенирования — 1 мкл

Праймеры прямой и обратный по 1,5 пмоль в пробирке

Плазмидная ДНК 37–75 нг

Водой доводят конечную реакционную смесь до 10 мкл

Чистка ПЦР-секвенирования:

1. В пробирки с образцами добавляют 2,5 мкл 0,125 М ЭДТА и 32,5 мкл 96 %-го спирта, оставляют в темноте не менее чем на 30 мин.

2. Центрифугируют при 14000 об/мин 20 мин.
3. Осторожно убирают надосадочную жидкость, осторожно не касаясь дна пробирки, чтобы не затянуть осадок.
4. Добавляют к осадку 62,5 мкл 70 %-го спирта, вортексируют, центрифугируют при 14000 об/мин 10 мин.
5. Осторожно убирают надосадочную жидкость. Оставляют сушить с открытыми крышками минимум 5 мин.
6. К осадку добавляют 15 мкл деионизированного формамида, денатурируют (95 °C – 5 мин – >4 °C – ∞).
7. Вносят образцы в плашку, загружают в секвенатор, запускают сиквенс согласно протоколу.

Результаты секвенирования сохраняются аппаратом ABIPRISM 3130 на компьютере в виде *.ab1 файлов. Первичная обработка выполняется в программе SeqAnalysis 5x. При этом визуально просматривают «сырые» данные электрофореза (пики) и оценивают качество сиквенса. Для анализа сиквенса используют программы Sequencing Analysis 5.2 и Bioedit. Референсные последовательности находятся в онлайн-базе Ensembl.org.

Выделение плазмид из среды культивирования

В том случае, если встроенный фрагмент соответствует референсной ДНК, плазмиды из клеток выделяют с использованием набора PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (LifeTechnologies, США), ручным способом либо наборами других производителей.

Рестрикция плазмид

Выделенные плазмиды переводят в линейную форму посредством рестрикции ферментами SmaI или EcoRI. Реакция протекает при 30–37 °C в течение 90 мин в объеме 10 мкл. Для рестрикции в одном эппендорфе смешивают: 1 мкл рестриктазы (SmaI/EcoRI) 2 мкл буфера 10x для рестрикции, 5 мкл матрицы, 2 мкл воды; общий объем реакционной смеси 10 мкл.

Определение концентрации плазмид и количества копий

Продукт рестрикции вносят в 2 %-й агарозный гель с целью определения концентрации выделенных плазмид. Используя полученную концентрацию (нг/мкл) и размер молекулы (пары оснований), определяют количество копий в 1 мкл раствора при помощи «Calculator for determining the number of copies of a template» (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

Серийные разведения плазмидной ДНК

По стандартной кривой получают серийные разведения линейаризованной плазмидной ДНК, содержащей соответствующие вставки sjTREC, sjKREC, альбумин, с шагом в 10 раз (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6). Количество TREC, KREC, альбумина подсчитывают с помощью ПЦР в реальном времени. Данные анализируют с использованием Fast RT-System (AppliedBiosystems).

Подготовка материала для исследования. Выделение ДНК из мононуклеаров периферической крови, костного мозга, «сухих пятен» крови

В качестве материала могут быть использованы свежие образцы периферической крови, «сухие пятна», а также мазки крови на гематологических стеклах. Забор образца периферической крови производится в стандартные

гематологические вакутайнеры или стерильные пробирки. В качестве антикоагулянта может использоваться ЭДТА или гепарин.

Для анализа в последующем подходят как фракция мононуклеаров, так и цельная фракция лейкоцитов.

Выделение ДНК из мононуклеаров

Образцы КМ/ПК наслаивают на 0,5 объема гистобака (Sigma, США) и центрифугируют при комнатной температуре в течение 25 мин при 1000 g.

Кольцо мононуклеарных клеток, сконцентрированных поверх гистобака, отбирают дозатором или постеровской пипеткой в другую пробирку, отмывают один раз фосфатно-солевым буфером, после чего супернатант сливают, а осадок клеток ресуспендируют в остаточной жидкости (около 100 мкл) и аликвотируют по пробиркам. Цельную фракцию лейкоцитов смешивают с буфером, лизирующим эритроциты, инкубируют 10 мин и центрифугируют. В случае наличия красного осадка этап отмывки лизирующим буфером повторяют, затем отмывают лейкоциты в PBS.

Выделение ДНК из образца цельной периферической крови

Образцы периферической крови либо костного мозга переносят в эппендорф и смешивают с RCLB в соотношении 1:3, инкубируют 10 мин и центрифугируют при комнатной температуре в течение 5 мин при 3000 g. В случае наличия красного осадка этап отмывки лизирующим буфером повторяют, затем отмывают лейкоциты в PBS.

Отмытые в PBS клетки в виде концентрированной суспензии тщательно перемешивают на вортексе (для разрушения осадка и комков клеток), распределяют в пробирки объемом 2,0 мл в количестве 5–10 млн и объеме суспензии не более 100 мкл. Лизирующий буфер (DB, от англ. digestion buffer) (100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) добавляют в объеме 100 мкл на 1 млн клеток, обычно 600–800 мкл. Сразу после добавления лизат перемешивают пипетированием (наконечник с широким носиком) и на вортексе. Лизис производят при 50–55 °С при перемешивании в течение 1–12 ч. Центрифугируют 1 мин при 5000 оборотов. Большим наконечником отбирается верхняя, водная фаза, которая переносится в новую пробирку.

Следующий этап — высаливание ДНК. При добавлении больших концентраций соли белок выпадает в осадок, а ДНК остается в растворе. К лизату добавляется 8 М ацетат аммония в объеме, равном половине (можно больше 0,5–1 V) объема лизата. Смесь тщательно перемешивают на вортексе и охлаждают. Центрифугируют при максимальных оборотах мин 10–20 с охлаждением. Отбирают водную фазу с ДНК и переносят в новую пробирку. В дальнейшем производят преципитацию и отмывку ДНК. Преципитация (осаждение) ДНК осуществляется равным объемом изопропанола. Смесь центрифугируют на 14000 оборотов 20 мин с охлаждением. Отбирают супернатант типсом или вакуумным аспиратором.

Выделение ДНК из «сухих пятен» крови. Участок картонной карты с нанесенной на нее каплей крови вырезают и делят на несколько фрагментов. Помещают их в пробирку на 2 мл, заливают DB-буфером и инкубируют в термошейкере при 50–55 °С в течение 2–12 ч или при 37 °С на ночь.

Далее выделение ДНК производят также, как и из цельной крови. Допустимо использование коммерческих наборов, которые предусматривают «сухие пятна» в качестве материала для выделения ДНК.

Растворение и измерение концентрации ДНК

ДНК растворяют в ТЕ-буфере (рН = 7,4 – 8,0). Стандартное растворение осуществляется в 150–200 мкл ТЕ-буфера. ДНК растворяют в термомиксере при 25–40 °С в течение 1 ч. После инкубации раствор ДНК нужно хорошенько потрясти на вортексе и осадить капли центрифугированием 5–10 с. Измерение выполняют на спектрофотометре NanoDrop, на трех независимых порциях ДНК, по 2 мкл, которые отбирают из пробирки с ДНК новым типсом после 4–5 пипетирований для каждого забора. 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; минимальная пороговая концентрация 10–15 нг/мкл.

В случае соответствия нормам данный материал принимают к исследованию.

Определение количества копий TREC и KREC методом ПЦР в реальном времени

Серия ПЦР выполняется с диагностической ДНК с установленной панелью праймеров. Полная панель включает в себя 3 пары праймеров и флуоресцентных зондов, включающих контрольный ген альбумин в качестве внутреннего контроля, а также праймеры на эписомальную ДНК-рецепторов.

Для проведения ПЦР необходимо приготовить стоковый раствор праймеров, который включает оригинальные праймеры и зонды с исходной концентрацией 100 пмоль/мкл. Концентраты и стоковые растворы хранят при -20 °С. Технология приготовления стоков описана в таблице 5.

Таблица 5. — Приготовление стока праймеров

	Исходная концентрация (пмоль/мкл)	Конечная концентрация (пмоль/мкл)	Объем (мкл)
Прямой праймер	100	6	6
Обратный праймер	100	6	6
Олигонуклеотидный зонд	100	4	4
Вода			До 100 мкл

Готовят реакционную смесь объемом 25 мкл. Готовый микс для ПЦР состоит из: TaqMan Master Mix, воды и стока праймеров (таблица 6). Постановку осуществляют в дублях.

Таблица 6. — Приготовление реакционной смеси

Реагенты	Объем на 1 реакцию (мкл)
TaqMan2хPCR Master Mix	12,5
Сток праймеров	1,25
Вода	6,25
кДНК (в микс не входит)	2,5

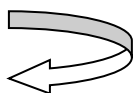
Аmplификацию проводят по протоколу:

50 °C — 2 мин

95 °C — 10 мин

95 °C — 15 с

60 °C — 60 с



50 циклов

Объем реакционной смеси для каждой мишени должен включать: число пациентов на данную мишень (Pn) + 2×отрицательных контроля (NAC+NTC) + плазмидные стандарты (St) + 15–30% от 1-й реакции в счет погрешности пипетирования (Ad). NAC (от англ. по amplification control) представляет собой заведомо отрицательную матрицу, т. е. ДНК, которая не содержит молекул TREC и KREC (например, клеточная линия HL60 или K562, в данном случае вносят деионизированную воду). Плазмидные стандарты приготовлены для каждой мишени и включают следующие концентрации: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 копий в 5 мкл.

Записывают схему раскапывания на специальном бланке. Раскапывают 96-луночную плашку или стрипы: сначала вносят реакционную смесь — 20 мкл, затем ДНК — 5 мкл, в последнюю очередь стандарты — 5 мкл. ДНК тщательно вортексируют и вносятся в равном объеме в каждую лунку. Стандарты предварительно выставляют при комнатной температуре для разморозки. Стандарты раскапывают в специально отведенной комнате для предотвращения контаминации ПЦР-боксов и самого помещения диагностической лаборатории.

Когда все образцы и стандарты внесены, необходимо герметично закрыть плашку соответствующими оптическими крышками или пленкой. Осадить плашку центрифугированием в течение 1 мин. Загрузить плашку в ПЦР-блок.

Анализ результатов

Для сравнительного анализа общий Threshold выставляют на 15–30-й цикл. Первым оценивают контрольный ген альбумин. Разница показателей Ct образцов в дубле не должна превышать 0,5 (это правило действительно и для всех остальных мишеней). Показатели Ct контрольного гена должны быть в диапазоне 18,0–28,0 циклов. При этом количество копий контрольного гена должно быть не менее 1000. Если показатель не укладывается в указанный диапазон, образец не может быть проанализирован. Если одна из лунок в дубле имеет положительное значение, а другая отрицательное, образец не может быть проанализирован. Положительным считается образец с S-образной амплификацией (логарифмическая шкала) и значением Ct ниже значения $Ct=Y\text{-intersept}$ стандартной кривой + один Ct. Для количественной оценки результатов используется метод «стандартной кривой», которая позволяет на основании экспериментальной модели пересчитать уровень амплификации (Ct) измеряемого образца в значение стандартного количества (SQ), которое выражает число мишеней в логарифмическом виде относительно эталонного образца. После завершения ПЦР прибор автоматически строит стандартную кривую. Каждая калибровка количественно характеризуется тремя параметрами:

- slope (наклон), или угловой коэффициент. Численно равен $\Delta Ct/\Delta SQ$ или тангенсу угла наклона стандартной кривой по отношению к оси абсцисс. В идеале для десятичной логарифмической шкалы SQ составляет 3,3;

- коэффициент корреляции (R) рассчитывается прибором автоматически как коэффициент Пирсона между разными разведениями; в идеале составляет 1;
 - интерсепт (intercept) — точка пересечения стандартной прямой оси ординат, количественно выражается в значении Ct, которое условно является порогом теоретической чувствительности метода.

При генерации отчета в программе запуска RQ-PCR автоматически рассчитываются средние значения Ct и SQ для всех образцов. Чувствительность метода 10^{-5} – 10^{-6} .

Интерпретация результатов. В случае, когда все критерии ПЦР «в режиме реального времени» выполнены, производится расчет количества копий TREC и KREC. Существует несколько принятых единиц измерения количества копий TREC и KREC: количество копий на 1 млн лейкоцитов или мононуклеаров периферической крови, количество копий на 1 мкг ДНК, а также на 1 мл крови; первый и последний вариант наиболее приемлемы.

Количество копий на 1 млн клеток рассчитывается исходя из того, что в каждой клетке присутствуют две копии контрольного гена, а количество молекул TREC или KREC не может быть более 1. Получаем формулу (1):

$$\frac{1\ 000\ 000 \times \text{среднее SQ (TREC или KREC)}}{\text{среднее SQ (Альбумин)/2}} = \text{копий TREC или KREC}/10^6 \text{ клеток} \quad (1)$$

Количество копий на 1 мл крови рассчитывается при наличии данных об абсолютном количестве лимфоцитов и моноцитов (если ДНК выделяли из мононуклеаров периферической крови) или общих лейкоцитов (если ДНК выделяли из общей фракции лейкоцитов или «сухих пятен») по формуле (2):

$$\frac{((\text{TREC или KREC})/106) \times (\text{Абс. Число (Lf+Mn)/мл})}{10^6} = \text{копий TREC или KREC/мл крови} \quad (2)$$

где * — вместо абсолютного числа лимфоцитов и моноцитов подставляют абсолютное число лейкоцитов в зависимости от исходного материала;

Lf — лимфоциты;

Mn — моноциты.

Например, среднее количество копий TREC по результатам RQ-PCR 100, а количество копий альбумина — 15000. Количество Lf+Mn = $(12,5 + 2,1) \cdot 10^9/\text{л}$ или $(12,5 + 2,1) \cdot 10^6/\text{мл}$. В результате получаем:

$$\frac{1\ 000\ 000 \times 100}{15\ 000/2} = 13\ 333 \text{ копий/млн клеток}$$

$$\frac{13\ 333 \times (12,5+2,1) \times 10^6}{10^6} = 194\ 661 \text{ копии/мл крови}$$

Далее полученные показатели сравнивают с референсными значениями для здоровых индивидов соответствующей возрастной категории (таблица 7).

Таблица 7. — Диапазон нормальных значений молекул TREC и KREC

	TREC		KREC	
	1–7-й день жизни	3–18 лет	1–7-й день жизни	3–18 лет
На 10^6 клеток	$10^3 - 4,5 \times 10^5$	$10^3 - 4,5 \times 10^5$	$5 \times 10^2 - 3 \times 10^5$	$5 \times 10^2 - 3 \times 10^5$
На 1 мл крови	$10^5 - 9 \times 10^6$	$10^4 - 6 \times 10^5$	$10^5 - 5 \times 10^6$	$10^4 - 3 \times 10^5$

Основополагающим является минимальное значение каждого показателя в таблице, так как оно является критическим для диагностики. Если число копий кольцевых молекул ДНК у пациента меньше нижнего предела, возникает подозрение иммунодефицитного состояния. Для уточнения выполняются дополнительные тесты.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствуют.