

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л.Пиневич
«*25*» *апреля* 2019 г.
Регистрационный № 179-1218



**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ
ГЕНОВ JAK2, CALR И MPL
(инструкция по применению)**

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Силин А.Е., Новик Д.К., к.б.н. Воропаева А.В., к.б.н. Мартинков В.Н.,
Тропашко И.Б., Силина А.А., Мартыненко С.М.

Гомель, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
25.04.2019

Регистрационный № 179-1218

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ
ГЕНОВ JAK2, CALR И MPL**

инструкция по применению

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

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

Гомель 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

JAK2 — ген из семейства нерецепторных тирозинкиназ

CALR — ген, кодирующий белок кальретикулин, играющий важную роль в клеточной пролиферации и дифференцировке, апоптозе, иммуногенной гибели клеток и др.

MPL — ген рецептора тромбопоэтина

ПЦР — полимеразная цепная реакция

НТФ — нуклеотидтрифосфаты

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод молекулярно-генетического анализа соматических мутаций V617F гена JAK2, del (тип I) и ins (тип II) гена CALR, W515L и W515K гена MPL посредством аллельспецифической ПЦР реакции с электрофоретической детекцией, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии и хронического идиопатического миелофиброза. Инструкция предназначена для врачей-гематологов, врачей-генетиков, врачей лабораторной диагностики, оказывающих медицинскую помощь пациентам с истинной полицитемией, эссенциальной тромбоцитемией и хроническим идиопатическим миелофиброзом в стационарных и амбулаторных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Высокоскоростная микроцентрифуга (до 10 000–12 000 ×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 постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 200В, УФ-трансиллюминатор с фотокамерой для съемки в УФ-свете.

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.

Набор реагентов для пробоподготовки и проведения ПЦР включает следующие компоненты: готовый коммерческий набор для экстракции ДНК из крови, буферный раствор для ПЦР, термостабильная ДНК-полимераза для «горячего старта» (Hot-start Taq-полимераза), 25 мМ MgCl₂, смесь НТФ, специфические олигонуклеотидные праймеры 10 мМ раствор, вода ПЦР-качества, компоненты для приготовления агарозного геля, буферных растворов для электрофореза, реагенты для окраски ДНК бромистым этидием.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Заболевание или патологическое состояние, характеризующееся одним или сочетанием признаков:

- уровень гемоглобина выше 165 г/л у мужчин и 160 г/л у женщин;
- гематокрит более 49 % у мужчин и более 48 % у женщин при отсутствии причин для симптоматического эритроцитоза;
- постоянный (более 6 мес.) тромбоцитоз, превышающий 450×10^9 /л;
- пролиферация мегакариоцитов с признаками атипии без ретикулинового фиброза, сопровождающаяся гиперклеточностью костного мозга, не соответствующей возрасту;

– пролиферация мегакариоцитов с признаками атипии в сочетании с ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Материал для исследования и пробоподготовка

Материалом для выделения ДНК с целью анализа соматических мутаций генов JAK2, CALR и MPL является цельная венозная кровь. Материал объемом 1 мл после забора переносится в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5 М ЭДТА (финальная концентрация 50 мМ). Выделение и очистка образцов ДНК осуществляется обычным доступным способом посредством соответствующих наборов реагентов.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение осуществляется при температуре -20 °С.

Полимеразная цепная реакция

1. Специфические олигонуклеотидные праймеры

Анализ мутации V617F осуществляется в пределах 14 экзона гена JAK2 посредством аллельспецифической ПЦР. Для ее тестирования используются три олигонуклеотидных праймера (таблица 1). Мутации del и ins гена CALR локализованы в 9 экзоне. Для их выявления амплифицируется весь 9 экзон с использованием при ПЦР двух праймеров (таблица 1). Каждая из мутаций W515L и W515K гена MPL (10 экзон) тестируется посредством аллельспецифической ПЦР с использованием трех праймеров (таблица 1).

Таблица 1. — Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР

Ген	Мутация	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, п.н.
JAK2	V617F	JAK2-F-2	ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGA AAG	364
		JAK2-Com-R	CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTT TCA	
		JAK2-F-Mut	AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATA TT	203
CALR	del ins	CALR-F	GCAGCAGAGAAACAAATGAAGG	157
		CALR-R	CTTCCTCCTTGTCCTCCTCA	
MPL	W515L	MPL-F	GCCGAAGTCTGACCSTTTTT	209
		MPL-R	ACAGAGCGAACCAAGAATGCCTGTTT ACA	
		515L-F	GGCCTGCTGCTGCTGAAGTT	124
	W515K	MPL-F	GCCGAAGTCTGACCSTTTTT	209
		MPL-R	ACAGAGCGAACCAAGAATGCCTGTTT ACA	
		515K-R	TGTAGTGTGCAGGAAACTGCTT	125

2. Условия для полимеразной цепной реакции

Смесь реагентов для 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 10 мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 2,0 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 происходит в амплификаторе с подогреваемой крышкой.

Программа для амплификации всех анализируемых фрагментов ДНК выглядит следующим образом: начальная денатурация — 5 мин при 95 °С, затем 35 циклов 30 с денатурации при 95 °С, отжиг праймеров — 30 с при 58 °С и элонгация 40 с при 72 °С. В завершении — финальная элонгация 5 мин при 72 °С и охлаждение до 4 °С.

3. Одновременная амплификация фрагментов генов JAK2 и CALR

Для сокращения времени исследования и затрат на реагенты производят совместную амплификацию фрагментов, в которых локализованы мутация V617F гена JAK2 и del/ins гена CALR. Для этого в ПЦР-смесь вносят 5 праймеров — JAK2-F-2, JAK2-Com-R, JAK2-F-Mut, CALR-F, CALR-R (таблица 1). Программа амплификации остается такой же, как и при индивидуальной ПЦР.

Электрофоретическая детекция результатов ПЦР

1. Подготовка геля и буферных растворов

Детекция результатов амплификации осуществляется посредством агарозного гель-электрофореза и окраски бромистым этидием в электрофоретической камере для горизонтального агарозного гель-электрофореза.

Для электрофоретического анализа необходимо приготовление 4 основных растворов реагентов. Для удобства использования изначально готовят концентрированные (стоковые) растворы, из которых путем добавления дистиллированной и деионизированной воды формируют рабочие растворы.

1. Подготовка стокового раствора 0,5 М EDTA, рН 8,0

Реагенты	Концентрация	На 100 мл
EDTA	0,5 М	18,62 г
NaOH	~0,5 М	2,028 г
H ₂ O		88,95 мл

EDTA не растворяется в воде при кислом рН, поэтому при растворении нужно добавлять щелочь и контролировать рН. Хранить раствор при 4 °С.

2. Подготовка трис-ЭДТА-боратного стокового раствора (20×)

Реагенты	Концентрация 1×	Концентрация 20×	Сток	На 500 мл
Трис	89 мМ	1,78 М	121,14 г/М	107,8 г
Борная кислота	89 мМ	1,78 М	61,83 г/М	55,03 г
EDTA 0,5 М, рН 8,0	2 мМ	40 мМ	500 мМ	40 мл
H ₂ O				863,3 мл

Рабочий раствор 1 × ТБЕ буфера готовят путем разведения 50 мл стокового раствора буфера (20 ×) до объема 1 л дистиллированной водой. Затем добавляют 50 мкл стокового раствора бромистого этидия (1 %).

3. Подготовка стокового раствора бромистого этидия 10 мг/мл (1 %)

Реагенты	На 10 мл
Бромистый этидий	0,1 г
H ₂ O	до 10 мл

4. Подготовка стокового (4 ×) загрузочного буфера для образцов

Реагенты	Концентрация	На 40 мл
Бромфеноловый синий 2 %	0,05 %	1 мл
Глицерин 100 %	70 %	28 мл
H ₂ O		11 мл

Электрофорез

Процедура электрофореза в стандартной камере для горизонтального агарозного электрофореза выглядит следующим образом:

1. Агарозу для электрофореза в количестве 1,7 г поместить в термостойкую стеклянную колбу на 250 мл. Добавить 100 мл рабочего раствора 1 × ТБЕ буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного расплавления агарозы (2 мин).

2. Залить расплавленную агарозу в специальную форму и установить гребенки в пазы на кювете.

3. Через 20 мин после полной полимеризации геля извлечь гребенки, не повреждая лунки. Поместить кювету с гелем в камеру для электрофореза. Залить в камеру для электрофореза рабочий раствор 1 × ТБЕ буфера так, чтобы слой буфера на 5 мм покрывал гель.

4. Добавить к каждому образцу (25 мкл амплификационной смеси) по 8 мкл 4× загрузочного буфера. Перемешать пипетированием.

5. Через слой буфера в отдельные лунки внести пипеточным дозатором по 12 мкл смеси ампликонов и загрузочного буфера, положительный, отрицательный контроли и маркер молекулярного веса.

6. Закрывать электрофоретическую камеру защитной крышкой и подключить электрофоретическую камеру к источнику питания, соблюдая полярность подключения.

7. Электрофорез осуществлять при 170 В в течение 25 мин для детекции фрагментов мутаций JAK2 и MPL. Для детекции мутаций гена CALR при индивидуальном тестировании, а также для детекции мутаций генов JAK2 и CALR после совместной амплификации электрофорез производят в течение 50 мин.

Интерпретация результатов анализа

Результат тестирования признается положительным при наличии на электрофореграмме дополнительных фракций, соответствующих по молекулярному весу аллельспецифическим фрагментам для генов JAK2 и MPL либо характерному паттерну фракций в случае мутации del или ins гена CALR. Примеры электрофоретической детекции мутаций генов JAK2, CALR и MPL после индивидуальной для каждой мутации ПЦР, а также после совместной ПЦР для детекции мутаций генов JAK2 и CALR представлены на рисунках 1–4. Для лучшей визуализации изображения представлены в инвертированном виде.

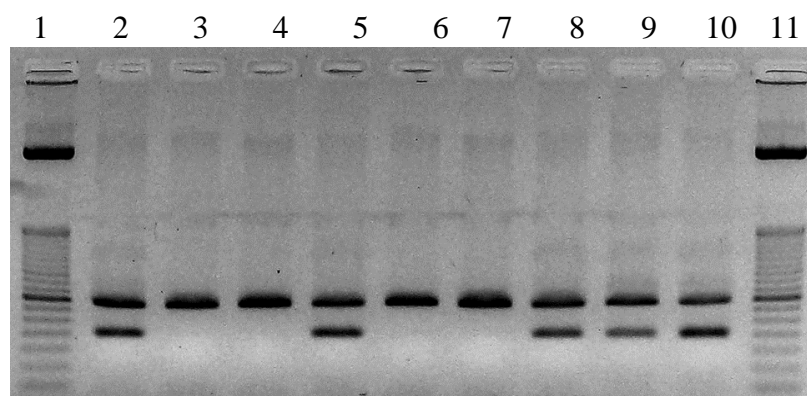


Рисунок 1. — Электрофоретическая детекция соматической мутации V617F гена JAK2 при использовании PCR с тремя различными праймерами в 1,7 % агарозном геле. Дорожки 3, 4, 6 и 7 — образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 2, 5, 8–10 — образцы, содержащие мутацию V617F гена JAK2, дорожка 1 и 11 — маркер молекулярного веса

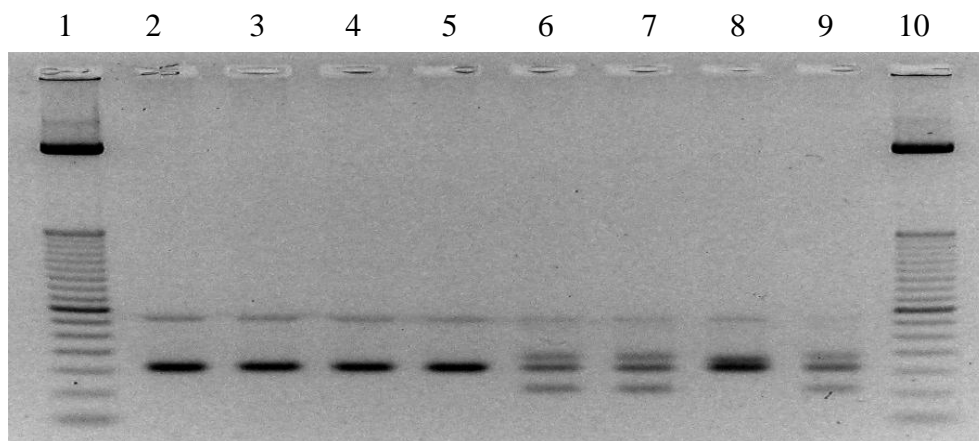


Рисунок 2. — Электрофоретическая детекция соматических мутаций del/ins гена CALR в 1,7 % агарозном геле. Дорожки 2–5 — образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 6, 7 и 9 — образцы, содержащие мутацию del гена CALR, дорожка 8 — образец, содержащий мутацию ins гена CALR, дорожка 1 и 10 — маркер молекулярного веса

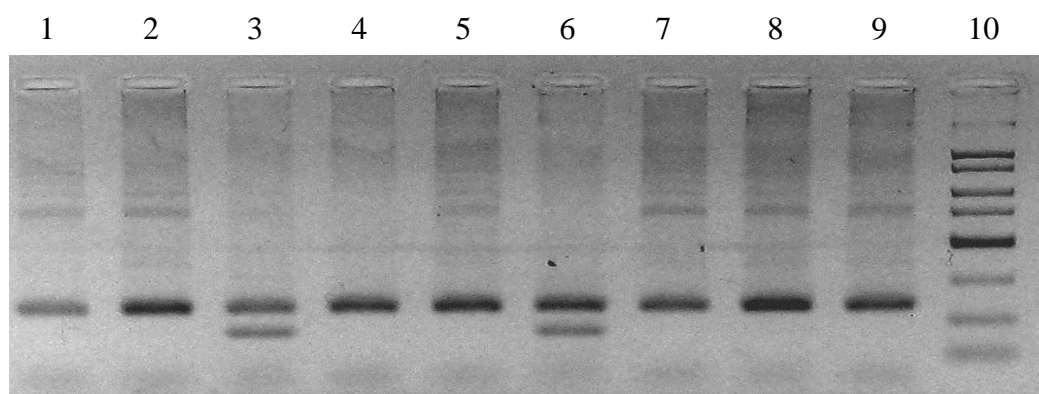


Рисунок 3. — Электрофоретическая детекция соматической мутации W515L гена MPL при использовании PCR с тремя различными праймерами в 1,7 % агарозном геле. Дорожки 1, 2, 4, 5, 7–9 — образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 3 и 6 — образцы, содержащие мутацию W515L гена MPL, дорожка 10 — маркер молекулярного веса

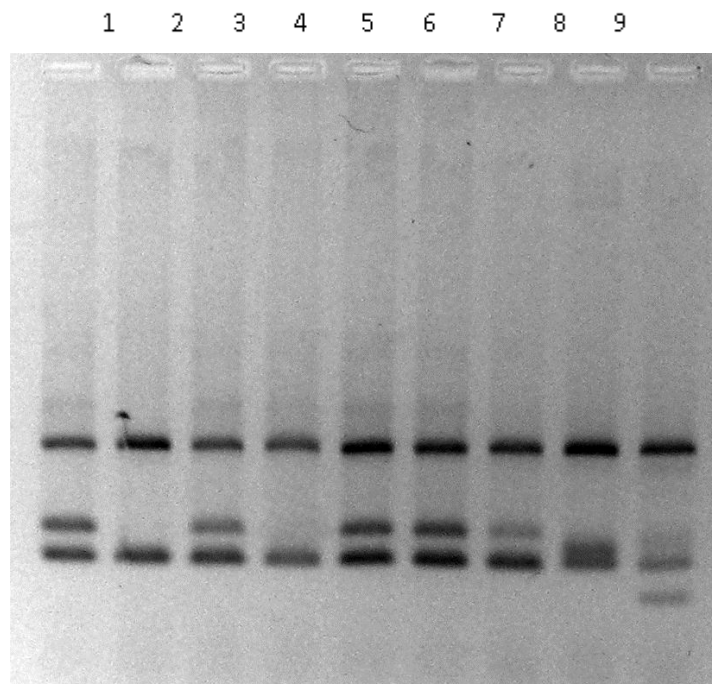


Рисунок 4. — Электрофоретическая детекция результатов совместной ПЦР фрагментов генов JAK2 и CALR в 1,7 % агарозном геле. Дорожки 2 и 4 — образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 1, 3, 5–7 — образцы, содержащие мутацию V617F гена JAK2, дорожка 8 — образец, содержащий мутацию *ins* гена CALR; дорожка 9 — образец, содержащий мутацию *del* гена CALR

Выявление какой-либо из тестируемых мутаций является диагностическим признаком, свидетельствующим о клональном характере миелопролиферации у пациента. Эта информация используется врачом-гематологом в комплексе с данными клинических, лабораторных и инструментальных исследований для верификации диагноза.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

В процессе молекулярно-генетического анализа наиболее распространенным признаком методических нарушений является слабая амплификация исследуемых фрагментов ДНК либо ее отсутствие. Это проявляется в виде нечетких фракций либо в их отсутствии после окраски электрофоретических гелей. Причин неудовлетворительных результатов может быть несколько. Основные из них: 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.

При электрофоретической детекции для получения более четкого фракционирования следует использовать только свежеприготовленные буферные растворы и избегать перегрева электрофоретической камеры.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель организации

(подпись)

(инициалы, фамилия)

« ____ » _____ 20__ г.

АКТ

о практическом использовании результатов исследования

В _____
(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования*)

Комиссия в составе _____
_____ настоящим подтверждает,
что _____

(название структурного подразделения организации)
*проведено опытно-промышленное испытание (осуществлено внедрение в технологический процесс, в учебный процесс и др.**)*

_____ (указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)
полученных _____

_____ (фамилия, имя, отчество автора (авторов) исследования)
при выполнении программы (проекта, темы НИР**) _____

_____ (название программы, проекта, темы НИР**)
для _____
(указываются решаемые практические задачи)

на основании чего _____
(приводятся конкретные результаты практического использования)

Экономический эффект от использования результатов составил _____
(расчет прилагается)***.

Члены комиссии:

(подпись)

(инициалы, фамилия)

(дата)