

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2014 г.

Регистрационный № 234-1223

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ  
ПРИЖИВЛЕНИЯ И ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА У  
ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д.м.н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси Алейникова О.В.,  
к.б.н. Савицкая Т.В., Марейко Ю.Е., Лавриненко В.А.

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) представлен метод диагностики приживления и отторжения трансплантата, основанный на исследовании донорского химеризма полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом для определения STR-мишеней и количественной полимеразной цепной реакцией для определения InDel-мишеней у реципиентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Результаты диагностики приживления и отторжения трансплантата на основе данного метода позволят проводить своевременную и адекватную терапию, контролировать ее эффективность у 100% реципиентов на всех этапах после операции, что улучшит исход заболевания у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-трансплантологов, врачей-гематологов, врачей-онкологов, врачей-иммунологов.

#### **Показания к применению**

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

#### **Противопоказания для применения**

Нет.

#### **Перечень необходимого оборудования и реагентов**

Выделение ДНК: спектрофотометр; вортекс; термоблок; высокоскоростная центрифуга, морозильник  $-20^{\circ}\text{C}$ ; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; пробирки объемом 0,5-1,5 мл; набор для выделения ДНК; вода для ПЦР.

Полимеразная цепная реакция с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом для определения STR-мишеней: шкаф для ПЦР; термоциклер для ПЦР; набор для амплификации STR-мишеней; морозильник  $-20^{\circ}\text{C}$ ; морозильник  $-70^{\circ}\text{C}$ ; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; пробирки объемом 0,2; вода для ПЦР; праймеры и зонды к STR-мишеням; генетический анализатор с программным обеспечением для проведения капиллярного электрофореза и фрагментного анализа; 96-

луночные плашки, септа, полимер, формаид, буфер для генетического анализатора.

Количественная полимеразная цепная реакция для определения InDel-мишеней: шкаф для ПЦР; термоциклер для ПЦР в реальном времени; морозильник  $-20^{\circ}\text{C}$ ; морозильник  $-70^{\circ}\text{C}$ ; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; пробирки объемом 0,2; оптически прозрачные планшеты и крышки для количественной ПЦР; вода для ПЦР; набор смеси для количественной ПЦР в реальном времени; праймеры и зонды к InDel-мишеням.

## **ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Принцип метода основан на количественной оценке ДНК клеток донора у реципиента после аллогенной ТГСК по отношению к количеству остаточной ДНК реципиента в образцах костного мозга и периферической крови.

Для различия ДНК донора и реципиента используют амплификацию гипервариабельных участков генома человека, которые представляют собой высокополиморфные образования, состоящие, например, из различного числа попарно повторяющихся последовательностей нуклеотидов (STR-мишени, short tandem repeat) или биаллельных инсерций/делеций участков ДНК (InDel-мишени, insertion/deletion).

Для амплификации STR-мишеней применяют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в которой используют меченые различными флуорохромами праймеры, фланкирующие интересующий локус. В ПЦР амплифицируются целый аллель и поэтому размер продукта определяется длиной и количеством повторов, для разделения и детекции которых используют программное обеспечение для фрагментного анализа после проведения капиллярного электрофореза. Размер каждого аллеля (в парах оснований) и количество ДНК оценивают исходя из показателей относительной флуоресценции и времени детекции сигнала.

Для амплификации InDel-мишеней применяют полимеразную цепную реакцию в реальном времени. Особенностью этого метода является

возможность количественного измерения ПЦР-продукта во время экспоненциальной фазы процесса амплификации. Для этого используют детекцию флуоресцентных сигналов во время каждого цикла ПЦР, возникающую при гидролизе меченой флуорохромом пробы (TaqMan пробы).

### **1. Подготовка образцов**

Мононуклеарные клетки выделяют из периферической крови и костного мозга на градиенте плотности 1,077 с последующей отмывкой в фосфатно-солевом буфере с pH-7,4. Выделение ДНК из 5 млн клеток проводят с помощью коммерческого набора. Количество ДНК оценивают спектрофотометрически. После определения количества, ДНК разводят до конечной концентрации 1 нг/мкл. Хранят образцы ДНК при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2. Метод полимеразной цепной реакции с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом для определения STR-мишеней**

Для амплификации STR-мишеней используют коммерческий набор, содержащий смесь праймеров к 10 STR локусам и локусу амелогенина в мультиплексной ПЦР, которые коамплифицируются в одной реакции с использованием праймеров меченых различными флуорохромами. Реакцию ПЦР выполняют в конечном объеме 17 мкл в составе: 8,4 мкл смеси для реакции, 0,4 мкл полимеразы для горячего старта с концентрацией 5 Ед/мкл, 0,44 мкл смеси праймеров и 4 нг исследуемой ДНК. Амплификацию проводят на термоциклире при следующих условиях:  $95^{\circ}\text{C}$  11 мин для активации полимеразы, 28 циклов с денатурацией при  $94^{\circ}\text{C}$  1 мин, отжигом при  $59^{\circ}\text{C}$  1 мин и элонгацией при  $72^{\circ}\text{C}$  1 мин, шаг финальной элонгации -  $60^{\circ}\text{C}$  - 45 мин.

Разделение продуктов ПЦР и детекцию флуоресценции проводят с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе согласно параметрам программного обеспечения. Для этого в лунки планшета вносят 9,25 мкл формамида, 0,25 мкл стандарта молекулярных весов (длиной 500 пар оснований) и 0,5 мкл продукта ПЦР. Образцы денатурируют при  $95^{\circ}\text{C}$  3 м, охлаждают на льду 3 минуты и загружают в прибор.

После капиллярного электрофореза проводят идентификацию аллелей с использованием оригинального программного обеспечения. При несовпадении аллелей у пары донор-реципиент, их рассматривают как информативные и используют в дальнейшем для подсчета смешанного химеризма в посттрансплантационных образцах. Для определения информативных аллелей используют образцы донора и реципиента, взятый до проведения ТГСК.

Рассчитывают донорский химеризм (ДХ) в посттрансплантационном образце как соотношение сигналов флуоресценции информативных аллелей донора и реципиента по относительной высоте пиков по формуле:

$$\text{ДХ\%} = (\Sigma \text{ ДНК донора}) / \Sigma \text{ общей ДНК в локусе} \times 100\%.$$

### **3. Метод количественной ПЦР для определения InDel-мишеней**

Принцип выполнения методики количественной ПЦР для определения InDel-мишеней заключается в следующем:

- в каждом образце донора и реципиента мишенями являются ДНК исследуемых локусов, а референс-геном – ДНК гена альбумина ABL (albumin).
- мишень и референс – ген амплифицируют в отдельных пробирках в дублях;
- первоначально донора и реципиента генотипируют по всем аллель-специфическим маркерам. Аллели учитывают как позитивные, если значение  $C_t$  (пороговый цикл) находится в пределах 20-26, и негативные, если значение  $C_t$  превышает 40 или отсутствует амплификация. Аллели считают информативными, если они являются позитивным для реципиента и негативным для донора или наоборот;
- для расчета эффективности реакции используют метод относительных стандартных кривых. Стандартные кривые в каждой реакции для информативных аллелей строят на основании серии разведений (100,10<sup>-1</sup>,10<sup>-2</sup>,10<sup>-3</sup>,10<sup>-4</sup>,10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>) ДНК донора в ДНК реципиента и наоборот.

Стандартные кривые оценивают математически с использованием программного обеспечения термоциклер для ПЦР в реальном времени по следующим показателям: коэффициенту корреляции (Correlation Coefficient), который отражает корреляцию показателя  $C_t$  разных разведений и должен быть

выше 0,990; эффективности ПЦР (PCR Efficiency), которая должна быть в пределах 90-110%; наклону стандартной кривой (Slope), который может варьировать в пределах -3,0 – -3,6.

В исследовании используют следующие праймеры для 18 локусов: для локуса S01a прямой 5'-GGTACCGGGTCTCCACATGA-3', обратный 5'-GGGAAAGTCACTCACCCAAGG-3', пробу: Fam- CTGGGCCAGAATCTTG-GTCCTCACA-BHQ1; для локуса S02 прямой 5'- GCTTCTCTGGTTGGAGT-CACG-3', обратный 5'- GCTTGCTGGCGGACCCT-3', пробу: Fam- CTGCAC-CACCAAATCATCCCCGTG-BHQ1; для локуса S03 прямой 5'-CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC-3', обратный 5'-TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA-3', пробу: Fam- CATACGTGCACAGGGTCCC-CGAGT-BHQ1; для локуса S04a прямой 5'- CTGGTGCCCACAGTTACGCT-3', обратный 5'- AAGGATGCGTGACTGCTATGG-3', пробу: Fam- TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA-BHQ1; для локуса S04b прямой 5'-CTGGTGCCCACAGTTACGCT-3', обратный 5'-AGGATGCGTGACTGCTCCTC-3', пробу: Fam- TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA-BHQ1; для локуса S05a прямой 5'-AAAGTAGACACGGCCAGACTTAGG-3', обратный 5'-CATCCCCACATACGGAAAAGA-3', пробу: Fam- CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT-BHQ1; для локуса S05b прямой 5'-AGTTAAAGTAGACACGGCCTCCC-3', обратный 5'-CATCCCCACATACGGAAAAGA-3', пробу: Fam- CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT-BHQ1; для локуса S06 прямой 5'-CAGTCACCCCGTGAAGTCCT-3', обратный 5'- TTTCCCCCATCTGCСТАТТG-3', пробу: Fam- CCCATCCATCTTCCCTACCAGACCAGG-BHQ1; для локуса S07a прямой 5'-TGGTATTGGCTTTAAAATACTGGG-3', обратный 5'-TGТАССААААСТCAGCTGCA-3', пробу: Fam- TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG-BHQ1; для локуса S07b прямой 5'-GGTATTGGCTTTAAAATACTCAACC-3', обратный 5'-CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT-3', пробу: Fam-

TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG-BHQ1; для локуса S08a прямой 5'- CTGGATGCCTCACTGATCCA-3', обратный 5'- TGGGAAGGATGCATATGATCTG-3', пробу: Fam- STCCCAACCCCAATTTCTGCCTG-BHQ1; для локуса S08b прямой 5'- GCTGGATGCCTCACTGATGTT-3', обратный 5'- TGGGAAGGATGCATATGATCTG-3', пробу: Fam- STCCCAACCCCAATTTCTGCCTG-BHQ1; для локуса S09b прямой 5'- GGGCACCCGTGTGAGTTTT-3', обратный 5'- CAGCTTGTCTGCTTTCTGCTG-3', пробу: Fam- TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG-BHQ1; для локуса S10a прямой 5'-GCCACAAGAGACTCAG-3', обратный 5'- TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT-3', пробу: Fam- CAGTGTCCCACTCAAGTACTCSTTTGGA-BHQ1; для локуса S10b прямой 5'- TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG-3', обратный 5'- TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT-3', пробу: Fam- CAGTGTCCCACTCAAGTACTCSTTTGGA-BHQ1; для локуса S11b прямой 5'- CCCTGGATCGCCGTGAA-3', обратный 5'- CCAGCATGCACSTGACТААСА-3', пробу: Fam- CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCSTTCC-BHQ1; для локуса ACE1428 прямой 5'-CCATTTCTCTAGACSTGCTGCC-3', обратный 5'- GCCCTTAGCTCACSTCTGCTT-3', пробу: Fam- TCACTTTTATGTGGTTTTCGCCAATTTTATTC-BHQ1; для локуса GST194 прямой 5'-GGAGAAGATTCGTGTGGACA-3', обратный 5'- CTGGATTGTAGCAGATCATAС-3', пробу: Fam- TTTGGAGAACCAGACCATGGACAAC-BHQ1; для референс-гена ALB прямой 5'-AGGGTAAAGAGTCGTCGATATGCT -3', обратный 5'- СААТСТСААСССАСТGTCAGCTA-3', пробу: Fam- САААСGСАТССАТТСТАССААСТTGAGCAT -BHQ1.

Уровень амплификации определяют с использованием прибора и программного обеспечения системы с детекцией в режиме реального времени. Реакцию проводят в объеме 20 мкл: 10 мкл смеси для количественной ПЦР, 100nM каждого праймера, 200 nM TaqMan пробы, 120 нг ДНК. Для ALB -

300nM каждого праймера, 200 nM TaqMan пробы. Условия ПЦР: 2 мин при 50°C, 10 мин при 95°C и 40 циклов амплификации (95°C - 45 сек и 62°C - 60 сек). Все образцы исследуют в дубликатах. ПЦР проводят как однокомпонентную реакцию (в каждой пробирке праймеры и зонд к одной мишени).

Алели считают информативными, если они являются позитивным для реципиента и негативным для донора или наоборот. Нормализуют количество исследуемых последовательностей ДНК в образце следующим образом:

$$\Delta\text{StИн} = \text{Их} - \text{ALBх};$$

где  $\Delta\text{StОн}$  – нормализованное значение  $\text{St}$  исследуемой последовательности ДНК в образце;  $\text{Ох}$  - значение  $\text{St}$  исследуемой последовательности ДНК в образце;  $\text{ALBх}$  - значение  $\text{St}$  референс-гена  $\text{ALB}$  в образце.

Для подсчета уровня донорского химеризма используют следующую формулу:

$$\text{ДХ}\% = (1 + \text{Е}) - (\Delta\text{StИн} - \Delta\text{StК}) \times 100\%$$

Где  $\text{ДХ}\%$  - значение донорского химеризма в процентах,  $\Delta\text{StИн}$  – нормализованное значение  $\text{St}$  исследуемой последовательности ДНК в образце;  $\Delta\text{StК}$  - значение  $\Delta\text{St}$  в калибраторе (в образце до трансплантации);  $\text{Е}$  – эффективность амплификации исследуемой последовательности ДНК. При уровне донорского химеризма более 95%, количество остаточных ДНК мишеней реципиента определяют по 1-2 информативным аллелям реципиента и уровень химеризма вычисляли по формуле:  $\text{ДХ}\% = 100\% - \%$  химеры реципиента.

### **Интерпретация результатов подсчета уровня донорского химеризма**

При диагностике уровня химеризма: более 97,5% - полный донорский химеризм (приживление трансплантата), менее 2,5% - полное отторжение трансплантата, 2,5 – 97,5% смешанный донорский химеризм. Увеличение химеризма на  $\geq 5\%$  говорит о повышении смешанного химеризма. Уменьшение на  $\geq 5\%$  о снижении смешанного донорского химеризма.



### **Возможные ошибки и осложнения**

Большую погрешность в измерение уровня химеризма могут вносить так называемые «stutter» пики, которые возникают в результате «скольжения» полимеразы в процессе амплификации на одну повторяющуюся единицу STR. При использовании тетранулеотидных STR, они появляются на 4 нуклеотида раньше амплифицируемого аллеля на электрофореграмме. Эти «stutter» пики могут вносить 5-15% вклад в пики перекрывающиеся с ними по размеру, а также симулировать картину смешанного химеризма при его низком уровне, если информативный аллель реципиента комигрирует со «stutter» пиком донорского аллеля. 'Stutter'-подобные пики могут появляться также после главного пика. Такие локусы должны быть исключены из анализа, особенно, когда четко определено наличие низкого уровня химеризма в других локусах. Эти особенности следует учитывать при подсчете уровня химеризма, особенно при его очень низких значениях (стремящихся к 0% ДХ) или при очень высоких (стремящихся к 100% ДХ).

Разная эффективность амплификации аллелей в мультиплексной ПЦР или аллельный дисбаланс является общим источником вариации, приводящей к  $\leq 15\%$  разнице в пределах пары аллелей донора или реципиента в 70-100% случаев, в зависимости от маркера.

Также погрешности существует при использовании метода количественной ПЦР для определения InDel-мишеней. При этой ПЦР разница в условиях амплификации между дублями влияет на точность определения значения химеризма: допустимая погрешности измерения порогового значения  $St \pm 0.5$  между дублями, что соответствует вариации количества ДНК до 50% (коэффициент вариации парных измерений=0-50%), при низких значениях химеризма эта погрешность незначительна, а при высоких не допустима. Для сравнения 100% химеризм при измерении может давать значения между 75% и 150%, что не пригодно для измерения химеризма, а при значении 1% может давать значения между 0,75% и 1,5%, что вполне допустимо.

Наиболее надежные результаты получают с использованием метода с STR-мишенями с уровнем химеризма от 3% до 97% ДХ. При этом главное достоинство метода на основе InDel-мишеней заключается в более высокой чувствительности, что делает возможным мониторинг химеризма при его низких и высоких значениях (менее 1% и более 97%).