

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л.Пиневиц

«_____» _____ 2018 г.

Регистрационный № 133-1118

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК ТКЕС И
ККЕС 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

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

Анализ количественного определения молекул ТКЕС и ККЕС 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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Врожденные и химиоиндуцированные нарушения иммунной
системы

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП - баз пар

ВСК - В-клеточный рецептор (от англ. В-cell гесергог)

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ - костный мозг

ПК - периферическая кровь

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ТСК - Т-клеточный рецептор (от англ. Т-cell гесергог)

Тад-ДНК полимераза - термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза

ФСБ - фосфатно-солевой буфер

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ТКЕС - эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора (от англ. Т-cell гесергог ехс18юп сшлез)

ККЕС - эксцизионное кольцо рекомбинации каппа цепи (от англ. карра- <Селет§ гесотЪтагюп ехс18юп сшлез)

К88 - сигнальная последовательность рекомбинации (от англ. гесотЪтагюп 81§па1 зедиепсе)

КСЬВ - буфер, лизирующий эритроциты (от англ. гес1 cell 1у818 ЁигГег)

Тад-полимераза - термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

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-1,5 мл

Пробирки объемом 15 мл

Прибор для электропорации

Кюветы для электропорации

Шпатели

Чашки Петри

Скальпель

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза

Морозильник -20⁰С.

Спектрофотометр

Термомиксер

Термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени

Центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза

РЕАКТИВЫ

Тад ДНК полимераза

Агароза

Бромистый этидиум

ДНК-маркеры

Вода деионизованная

Изопропанол

Ацетат аммония 8М

Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)

Лизирующий буфер (БВ)

Флуоресцентно-меченные праймеры для амплификации генов альбумина ТКЕС, ККЕС

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-акриламил(39:1)

Персульфат аммония

Тетес - компонент необходимый для полимеризации полиакриламидного геля

Трис-борат-ЭДТА(ТВЕ) буфер

8-Oa1 среда- хромогенный субстрат, содержащий в-галактозидазу

БВ агар (от англ. Бипа Ъгот)- лизогенная богатая среда для роста культур бактерий

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 ТКЕС, ККЕС и контрольного гена АБВ
 - 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 культивированной 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 ТКЕС и ККЕС методом реакции ПЦР в «реальном времени
6. Анализ результатов

1. Подбор праймеров для амплификации и клонирования

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

Таблица 1 - Праймеры для ПЦР амплификации гена альбумин

Название	Последовательность 5'-3'	Размер
АВВ Рогоуаё	ТООАСАООСОАССАТОСТТ	19
АВВ Кеуегве	СТСТССТТСТСАОАААОТОТОСАТАТ	26
АВВРгоЪе	ТООТООАААСАТТСАССТТССАТОСАОА	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 8]ТКЕС заключалась в том, что локус дельта цепи ТСК, который подвергается делеции, располагается внутри генов альфа цепи на 14 хромосоме (рис.1).

Геномные координаты: (ОКСп38): 14:22,462,931-22,466,576.

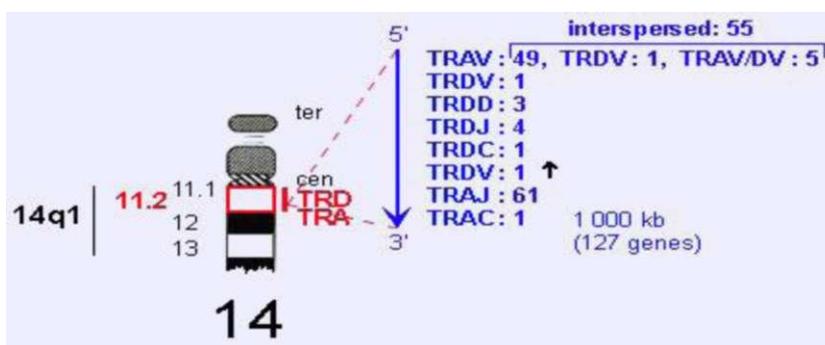


Рисунок 1 - Карта расположения генов альфа и дельта цепей ТКР

(ОпенЛ(1аз))

В связи с этим праймеры подбирали на участок соединения линейного фрагмента дельта цепи ТСК, по краям которого располагаются делетирующие последовательности 5Кес и ЧЧа (рис.2). В

геномной ДНК расстояние между этими участками составляет более 88 000 нуклеотидов. Однако в кольцевой молекуле 8]ТКЕС данные сегменты соединяются, в результате чего становится возможной амплификация кольцевой молекулы.

Усе У61 Уа бКес У52-052^61 -т^Ц-, С5 У83 ч^а, ————— ^ —————, Са
 - ЕИ / - ЕИ / - СИ / - ^ К1 — « — ЕЗ ЧЗ — : ^ 1 М Н Н Н Ъ Н Н Н Н Ж Ъ - Е ^

Рисунок 2 - Расположение генных сегментов альфа и дельта цепи.

Первая реарранжировка проходит на границе делегирующих сегментов дельта цепи 5Кес и ЧЧа

Таблица 2 - Праймеры для ПЦР амплификации кольцевой молекулы ДНК уТКЕС (ЖМЮ0014.9)

Название	Последовательность 5' - 3'	Размер
уТКЕС Роруагё	ССАТОСТОАСАССТСТООТТ	21
уТКЕС Кеуегве	СТТСАТТСАССОТТСТСАСОА	21
8]ТКЕС РгоЪе	САСООТОАТОСАТАООСАССТОС	23

Размер продукта - 197 нуклеотидов. Прямой праймер располагается в последовательности ЧЧа, а обратный праймер и проба - в участке, кодирующем 5Кес.

Подбор праймеров для 8]ККЕС сходно с таковым для ТСК. Расположение локусов каппа цепи иммуноглобулина показано на рисунке 3. Праймеры подбирают на делегирующие фрагменты каппа цепи 1ОК.

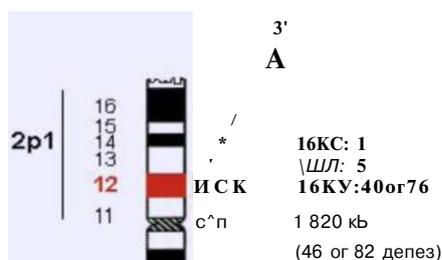


Рисунок 3 - Карта расположения генных сегментов 1ОК

В геномной ДНК расстояние между данными фрагментами составляет порядка 100 000 нуклеотидов, однако, после рекомбинации ЮКБЕБ с фрагментом К88, они сближаются и размер амплифицируемого фрагмента составляет 148 нуклеотидов.

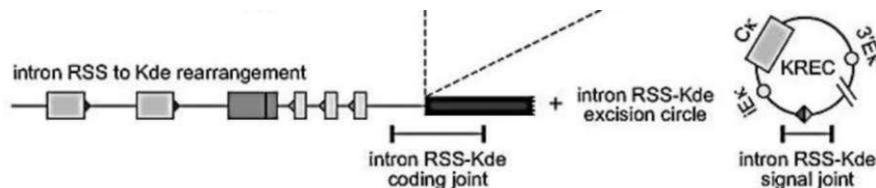


Рисунок 4 - Расположение геномных сегментов и регуляторных последовательностей 10К

Таблица 3 - Праймеры для ПЦР амплификации кольцевой молекулы ДНК 8]ККЕС (N0,018913.2)

Название	Последовательность 5' - 3'	Размер
8]ККЕС Poryaгё	ТСАОСОССАТТАСОТТТСТ	20
8]ККЕС Keyeгве	ОТООООАСОСОАСС	17
8] ККЕС Proгё	ССАОСТСТТАСССТАОАОТТТСТОСАСО	29

2. Оптимизация условий ПЦР

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) 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 5xВшТег (Pготеда СогрогаНоп, США), 0,2 мкл 25 тМсЮТР, 1,5 мкл 25 тМ М§СЪ (Pготеда Согрогагюп, США), 0,15 мкл 5СТ ТаяРо1, по 0,125 мкл праймеров Р/К 100р Мо1 (Праймтех, Беларусь), 15,9 мкл Н2О, либо реагентами других компаний производителей. С целью оптимизации реакции выбирают температурный градиент отжига праймеров в диапазоне от 58 до 62°С. Условия ПЦР реакции следующие:

95 °С - 10 мин.

95°С - 15 сек

58-62°С - 20 сек ^ ^ ^ ^

72°С - 30 сек < ^ = ^ 35 циЮТ.в

72°C - 5 мин

4°C - ∞

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

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

3. Клонирование генов ТКЕС, ККЕС и контрольного гена АБВ

Для количественной оценки копий кольцевых молекул ТКЕС, ККЕС и контрольного гена АБВ необходимо создание плазмидных стандартов с четко установленным количеством молекул в мкл. Для выполнения данной задачи проводят клонирование амплифицированных фрагментов ТКЕС, ККЕС и АБВ в плазмидный вектор рТ257К/Т или любой другой коммерчески доступный вектор. Процесс клонирования включает несколько этапов.

3.1 Очистка ПЦР продукта

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

Таблица 4 - Приготовление 8% полиакриламидного геля для чистки

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

После добавления темеда и персульфата аммония все тщательно перемешивают и в течение 3 минут заливают гель в заранее собранные стекла со спейсерами. Погружают в гель гребенки для формирования лунок. Оставляют гель полимеризоваться на 1-2 часа. 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:

50В - 10 мин

100В - 10 мин

150В - 10 мин

250В - 10 мин

300В - часа

После окончания программы электрофореза, стекла разбирают и гель окрашивают в 0,5 кратном растворе этидиум бромид в течение 5–10 минут. Затем перекладывают на детектирующую камеру.

Определение размеров производят путём сравнения наборов коммерческих фрагментов ДНК известной длины (например, «O'Оепе Килег 1ac1c1er») 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 и оставляют элюироваться на ночь.

3.2 Измерение концентрации полученного продукта

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

5 мкл продукта ПЦР вносят в лунки агарозного геля, содержащего этидиум бромид. Электрофорез проводят в течение 45 минут при напряжении 150В 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.

3.3 Лигирование очищенных ПЦР продуктов с плазмидным вектором

Лигирование проводят с использованием набора КарЫ Б1§а1юп&Тгап8тгтаюп *КИ* (Регтеп1а8) согласно прилагаемой инструкции. В качестве вектора используют плазмиду рТ257К/Т. Соединение ДНК вставки с вектором осуществляют по ТА-концам. Соотношение концентраций вставка/вектор определяют с помощью программы «Ыдагюп Са1силагог». Реакция лигирования протекает ночь при +4°С.

3.4 Трансформация

Трансформацию проводят с использованием СаС12. В качестве компетентных клеток используют штамм ХЫ1-В1ие бактерии *E.coli*. Получение компетентных клеток проводят кальций-холодовым методом по Т. Матаг18. В 5 мл бульона БВ вносят отдельную колонию клеток *E.coli*. Флакон помещают на шейкер и инкубируют при 37°С в течение 3 часов. В стерильные эппендорфы вносят полученную культуру клеток по 1,5 мл, охлаждают до +4°С и центрифугируют 10 мин при +4°С при 3000 об/мин, осадок ресуспендируют в 500 мкл 0,1М СаСЪ. Образцы помещают на +4°С на 40 мин. с последующим центрифугированием 10 мин. при +4°С при 3000 об/мин. Полученный осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,1М СаС12.

В 100 мкл суспензии клеток вносят 100 нг плазмидной ДНК, выдерживают 30 мин. при +4°C, проводят тепловой шок при 42°C в течение 90 с, быстро охлаждают на льду в течение 2 мин, после чего добавляют бульон ББ 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 8-Oa1, содержащую субстрат, при расщеплении которого колонии окрашиваются в черный цвет в случае, когда *Bac* оперон плазмиды остается не поврежденным. Если же колонии становятся белыми, значит легирование встраиваемого ДНК фрагмента и вектора прошло успешно, т.к. *Bac* оперон плазмиды является сайтом встраивания участка гена. После трансформации клетки культивируют 18 ч в термостате при 37°C.

3.5 Проверка специфичности

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

3.6 Секвенирование плазмид и проверка их аутентичности

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

Для секвенирования необходимо:

Флуоресцентно-меченные нуклеотиды (B1§ Буе) - 1 мкл

5x ВшТег для секвенирования - 1 мкл

Праймеры прямой и обратный по 1,5 п/моль 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 0.125М ЭДТА и 32,5 96% спирта, оставляют в темноте не менее чем на 30 минут.
2. Крутят в центрифуге 14 000 оборотов 20 минут.
3. Убрать надосадочную жидкость, осторожно не касаясь дна пробирки, чтобы не затянуть осадок.
4. Добавляют к осадку 62,5 мкл 70% спирта, вортифицируют, центрифугируют 14 000 оборотов 10 минут.
5. Осторожно убирают надосадочную жидкость. Оставить сушить с открытыми крышками минимум 5 минут.
6. К осадку добавляют 15 мкл деионизированного формамида, денатурируют (95 С-5 минут->4С +со).
7. Вносят образцы в плашку загружают в секвенатор, запускают сиквенс согласно протоколу.

Результаты секвенирования сохраняются аппаратом AB1PK18M 3130 на компьютере в виде *.ABI файлов. Первичная обработка выполняется в программе SeqLab 5x. При этом визуально просматривают «сырые» данные электрофореза (пики), и оценивают качество сиквенса. Для анализа сиквенса используют программы SeqScape 5.2 и Vector NTI. Референсные последовательности находятся в онлайн базе GenBank.

3.7 Выделение плазмид из среды культивирования

В том случае, если встроенный фрагмент соответствует референсной ДНК, плазмиды из клеток выделяют с использованием набора Qiagen® QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, США), ручным способом, либо наборами других компаний производителей.

3.8 Рестрикция плазмид

Выделенные плазмиды переводят в линейную форму посредством рестрикции ферментами *Sma*I или *Eco*KI. Реакция протекает при 30/37°C в течение 90 минут в объеме 10 мкл. Для рестрикции в одном эппендорфе смешивают: рестриктазу (*Sma*I/*Eco*KI) 1 мкл, 2 мкл буфера 10x для рестрикции, 5 мкл матрицы, 2 мкл воды, общий объем реакционной смеси 10 мкл.

3.9 Определение концентрации плазмид и определение количества копий

Продукт рестрикции вносят в 2% агарозный гель с целью определения концентрации выделенных плазмид. Используя полученную концентрацию (нг/мкл) и размер молекулы (пары оснований) определяют количество копий в мкл раствора при помощи «Calculagor Юг <Selegttt§ те питег оГ cople8 оГ а letplate» (<http://ce18.ig1.eei/e8c/спёпа.Ыт1>).

3.10 Серийные разведения плазмидной ДНК

По стандартной кривой получают серийные разведения линеаризованной плазмидной ДНК, содержащей соответствующие вставки *8ДКЕС*, *8]ККЕС*, альбумин, с шагом в 10 раз (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6). Количество *ТКЕС*, *ККЕС*, альбумин подсчитывают с помощью ПЦР в реальном времени. Данные анализируют с использованием *Pa81* *КТ-8y81ет* (*AppHe<СВю8y81:ет8*).

4. 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.

4.1 Выделение ДНК из мононуклеаров

Образцы КМ/ПК наслаивают на 0,5 объема N18горадие (81шта, США) и центрифугируют при комнатной температуре в течение 25 минут при 1000 д.

Кольцо мононуклеарных клеток, сконцентрированных поверх гистобака, отбирают дозатором или постеровской пипеткой в другую пробирку, отмывают один раз фосфатно-солевым буфером (PB8, от англ. Рbо8рbale БигГег 8аНпе), 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 (КСБВ, от англ. Ке<С cell ly818 БигГег), инкубируют 10 минут и центрифугируют. В случае наличия красного осадка этап отмывки лизирующим буфером повторяют. Затем отмывают лейкоциты в PB8.

4.2 Выделение ДНК из образца цельной периферической крови

Образцы периферической крови либо костного мозга переносят в эппендорф и смешивают с КСВВ в соотношении 1:3, инкубируют 10 минут и центрифугируют при комнатной температуре в течение 5 минут при 3000 д. В случае наличия красного осадка этап отмывки лизирующим буфером повторяют. Затем отмывают лейкоциты в РВ8.

Отмытые в РВ8 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 (БВ, от англ. сNде8ггоп ЫГГег) (100тМ ШС1, 10тМ ТшНСЬ, 25 тМ ЕБТА, 0,5% 8Б8) 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 проводят при 50-55°C при перемешивании в течении 1- 12 часов. Центрифугируют 1 мин. при 5 000 оборотов. Большим наконечником отбирается верхняя, водная фаза. Водная фаза 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 8М 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 минут 10-20 с охлаждением. Отбирают водную фазу с ДНК и переносят в новую пробирку. В дальнейшем проводят преципитацию и отмывку ДНК. Преципитация (осаждение) ДНК осуществляется равным объемом изопропанола. Смесь центрифугируют на 14 000 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 БВ буфером и инкубируют в термошейкере при 50-55°C в течение 2-12ч или при 37°C на ночь. Далее выделение ДНК проводят также как и из цельной крови. Допустимо использование коммерческих наборов, которые предусматривают «сухие пятна» в качестве материала для выделения ДНК.

4.3 Растворение и измерение концентрации ДНК

ДНК растворяют в ТЕ буфере (рН = 7,4 - 8,0). Стандартное растворение в 150-200 мкл ТЕ-буфера. ДНК растворяют в термомиксере при 25-40°C в течение 1 часа. После инкубации раствор ДНК нужно хорошенько потрясти на вортексе, и осадить капли центрифугированием 5-10 сек. Измерение выполняют на спектрофотометре КапоБгор. Измерение проводят 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 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. Рабочий раствор ДНК должен иметь концентрацию 100-150 нг/мкл. Минимальной пороговой концентрацией является 10-15 нг/мкл

В случае соответствия нормам данный материал принимают к исследованию.

5. Определение количества копий ТКЕС и ККЕС методом реакции ПЦР в «реальном времени»

Серия ПЦР-реакций, выполняемых 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 так же 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°C. 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: ТадМап Ма81ег М1х, воды и стока праймеров (таблица 6). Постановку осуществляют в дублях.

Таблица 6 - Приготовление реакционной смеси

Реагенты	Объем на 1 реакцию (мкл)
ТаяМап2хРСК Ма81ег М1х	12,5
Сток праймеров	1,25
Вода	6,25
кДНК (в микс не входит)	2,5

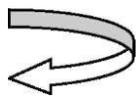
Аmplификацию проводят по протоколу:

50°C - 2 мин.

95°C - 10 мин.

95°C - 15 сек

60°C - 60 сек



50 циклов

Объем реакционной смеси для каждой мишени должен включать: количество пациентов на данную мишень (Рп) + 2*отрицательных контроля (КАС+1ЧТС) + плазмидные стандарты (81) + 15-30% от 1-й реакции в счет погрешности пипетирования ($A < 3$). КАС (от англ. по атрНйсаНоп соп1го1) представляет собой заведомо отрицательную матрицу, т.е. ДНК, которая не содержит молекул ТКЕС и ККЕС (например, клеточная линия ЫЬ60 или К562 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 реакционная 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 минуты. Загрузить плашку в ПЦР-блок.

6. Анализ результатов

Для сравнительного анализа общий ТпгезпоЫ выставляют на 15-30 цикл. Первым оценивают контрольный ген альбумин. Разница показателей С образцов в дубле не должна превышать 0,5 (это правило действительно и для всех остальных мишеней). Показатели С 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 8-образной амплификацией (логарифмическая шкала) и значением С ниже значения $C = Y - t1eg8er1$ стандартной кривой + один С1 Для количественной оценки результатов используется метод «стандартной кривой», которая позволяет на основании экспериментальной модели пересчитать уровень амплификации (С1) измеряемого образца в значение стандартного количества (8С>), которое выражает количество мишени 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 $AS1/A8C$) или тангенсу угла наклона стандартной кривой по отношению к оси абсцисс. В идеале для десятичной логарифмической шкалы 8С> составляет 3,3.

• коэффициент корреляции (K). Рассчитывается прибором автоматически как коэффициент Пирсона между разными разведениями. В идеале составляет 1.

• интерсепт (Intercept) - точка пересечения стандартной прямой ось ординат, количественно выражается в значении C1, которое условно является порогом теоретической чувствительности метода.

При генерации отчета в программе запуска K((-PCK автоматически рассчитываются средние значения C и S 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 ТКЕС и ККЕС. Существует несколько принятых единиц измерения количества копий ТКЕС и ККЕС: 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 присутствует две копии контрольного гена, а количество молекул ТКЕС или ККЕС не может быть более 1. Получаем следующую формулу:

$$\frac{1\ 000\ 000 \times \text{среднее } S(\text{ТКЕС или ККЕС})}{\text{среднее } 50 \cdot \{\text{Альбумин}\}/2} = \text{копий ТКЕС или ККЕС}/10^6 \text{ клеток}$$

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 из «сухих пятен») по следующей формуле:

$$\frac{\{(ТКЕС \text{ или } ККЕС)/106\} \times (\text{Абс. Число } (1Г+Мп)/мл)}{10^6} = \text{копий ТКЕС или КРЕС/мл крови}$$

*- вместо абсолютного числа лимфоцитов и моноцитов подставляют абсолютное число лейкоцитов, в зависимости от исходного материала, БГ - лимфоциты, Мп - моноциты.

Например, среднее количество копий ТКЕС по результатам К((-РСК) получилось 100, а количество копий альбумина - 15 000. Количество БГ+Мп = $(12,5+2,1) \cdot 10^9/л$ или $(12,5+2,1) \cdot 10^6/мл$. В результате получаем:

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

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

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

Таблица 7 - Диапазон нормальных значений молекул ТКЕС и ККЕС

	ТКЕС		ККЕС	
	1-7 день жизни	3-18 лет	1-7 день жизни	3-18 лет
На 10^6 клеток	$10^3 - 4,5 \cdot 10^5$	$10^3 - 4,5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^5$
На 1 мл крови	$10^5 - 9 \cdot 10^6$	$10^4 - 6 \cdot 10^5$	$10^5 - 5 \cdot 10^6$	$10^4 - 3 \cdot 10^5$

Основополагающим является минимальное значение каждого показателя в таблице, т.к. оно является критическим для диагностики. Если число копий кольцевых молекул ДНК у пациента меньше нижнего

предела возникает подозрение на иммунодефицитное состояние. Для уточнения проводятся дополнительные тесты.

Возможные ошибки и осложнения: отсутствуют.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

«20» _____ 2018 г.

Регистрационный № 133-1118



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК ТКЕС И
ККЕС 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.М., Жарапкина Ю.С., к.м.н. Мишаковская
Н.В., к.б.н. Белевцев М.В., д.м.н, профессор, член-корр. НАП Беларуси
Алейникова О.В.

Минск, 2018