

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л.Пиневиц

_____ 2013г.

Регистрационный № *237-1213*

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБЕРРАЦИЙ ГЕНА IKZF1 ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Мелешко А.Н., Прохореня И.В.

Минск, 2013

Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТП – дезоксинуклеотидил трифосфаты, смесь

КМ – костный мозг

МОБ – минимальная остаточная болезнь

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

НХЛ – неходжкинская лимфома

ПК – периферическая кровь

п.о. – пар оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Ik1-10 – Ikaros, продукт гена IKZF1, изоформы 1-10

RQ-PCR – real-time quantitative PCR (ПЦР «в реальном времени»)

PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis

PBS – phosphate buffered saline

SDS– sodium dodecyl sulfate (лаурилсульфат натрия)

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения нарушений гена опухолевого супрессора IKZF1 (Ikaros), ассоциированных с неблагоприятных прогнозом ОЛЛ.

Область применения метода: молекулярная биология, гематология, онкология.

Настоящая инструкция по применению предназначена для врачей лабораторной диагностики, занимающихся диагностикой лейкозов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

C91 Лимфоидный лейкоз [лимфолейкоз]

C91.0 Острый лимфобластный лейкоз

C91.1 Хронический лимфоцитарный лейкоз

C91.2 Подострый лимфоцитарный лейкоз

C91.3 Пролимфоцитарный лейкоз

C91.5 Т-клеточный лейкоз взрослых

C91.7 Другой уточненный лимфоидный лейкоз

C91.9 Лимфоидный лейкоз неуточненный

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Для указанных нозологий отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ

ОБОРУДОВАНИЕ

Центрифуга для пробирок 15-50 мл

Центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин

Термомиксер

Вакуумный аспиратор

Вортекс

Морозильник –20°C

Морозильник –80°C

Спектрофотометр

ПЦР боксы

Термоциклер

Аппарат для ПЦР в реальном времени (термоциклер с оптическим блоком)

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле

Документирующая система

Дозаторы

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Вакутайнеры (пробирки для забора крови), КЭДТА, 10-15 мл

Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем – от 0,1 до 1000 мкл)

ПЦР-пробирки (0,2 мл)

96-луночные плашки с прозрачной пленкой

Оптические ПЦР-пробирки 0,2 мл
Пробирки типа эппендорф (0,5; 1,5; 2,0 мл)
Центрифужные пробирки 15 и 50 мл

РЕАГЕНТЫ

ЭДТА

Ингибиторы РНКаз (RNAlater)

Гистопак (Histopaque) или Лимфопреп

Фосфатно-солевой буфер, pH=7,4

NaCl

Трис-HCl

ЭДТА

SDS (лаурил-сульфат натрия)

Протеиназа-К

Хлороформ

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

Изопропанол

Ацетат аммония

B-меркаптоэтанол

Три-реагент

Этанол

Олиго-dT (dT18) олигонуклеотиды

Смесь трифосфатдезоксинуклеотидов (дНТФ)

Обратная транскриптаза

Тaq-полимераза

Олигонуклеотиды (праймеры)

Флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды (TaqMan-пробы)

Агароза

Вода деионизованная

Маркер молекулярного веса

Трис-боратный буфер, рН=7,5

Этидиум бромид

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Суть метода состоит в выявлении с помощью ПЦР делеций или нарушений сплайсинга в гене IKZF1 (Ikaros), ассоциированных с неблагоприятным прогнозом при лейкозах. Ген IKZF1 является гематопоэтическим транскрипционным фактором, ключевым для лимфоидной дифференцировки, и опухолевым супрессором. Характерными для лейкозов аберрациями этого гена являются внутривенные делеции, а также нарушения сплайсинга, ведущие к экспрессии коротких, доминантно-негативных изоформ. Соответственно, метод диагностики этих нарушений включает три независимых анализа, каждый из которых расширяет и подтверждает результаты других:

1. Анализ двух наиболее распространенных делеций внутри гена IKZF1 с помощью классической ПЦР и электрофореза в агарозном геле;
2. Количественный ПЦР анализ в «реальном времени» (RQ-PCR) для определения делеций гена IKZF1 с использованием геномной ДНК из лейкозных клеток;
3. Количественный ПЦР анализ в «реальном времени» (RQ-PCR) для определения уровня экспрессии длинных (функциональных) и коротких (доминантно-негативных) изоформ Ikaros.

Первые два анализа выполняются на геномной ДНК, полученной из лейкозных клеток КМ и могут применяться для диагностического скрининга в составе комплекса молекулярно-генетической диагностики первичных лейкозов и рецидивов. Первый метод не требует RQ-PCR и включает только традиционную ПЦР и электрофорез в агарозном геле. Второй метод количественный, основан на RQ-PCR и позволяет выявлять те же две делеции локуса IKZF1. Это более быстрый анализ, выполнимый в течение одного рабочего дня.

Третий анализ проводится на кДНК, синтезированной на основе РНК лейкозных клеток пациентов. Этот метод предоставляет дополнительную информацию по уровню и профилю экспрессии различных изоформ Ikaros. Диагностическим признаком является сверхэкспрессия коротких изоформ Ikb, 9, 10. Как правило, их сверхэкспрессия являются результатом внутригенной делеции. Подробная информация по интерпретации результатов анализа приводится в соответствующем разделе инструкции.

1. Биопсия опухолевого материала

Материалом для выполнения метода является костный мозг пациентов при презентации заболевания или рецидиве лейкоза, при содержании бластных клеток не менее 50%. 2-5 мл костно-мозговой пункции забираются в вакутайнер с ЭДТА в качестве коагулянта. В случае костномозговой пункции в разных местах материал биопсии допускается смешивать на уровне выделения клеток или ДНК/РНК. Бластные клетки выделяются вместе с фракцией мононуклеаров путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077 г/мл. Клетки один раз фосфатно-солевом буфере (PBS), подсчитываются в камере Горяева и разделяются по 10 млн и используются для выделения ДНК/РНК.

2. Выделение ДНК, РНК и синтез кДНК

Для выделения геномной ДНК клетки лизируют в буфере для лизиса (DB-буфер) (100мМNaCl, 10 мМtris-HCl, 25 мМ EDTA, 0,5 SDS, 0,1 мкг/мкл протеиназа-К, рН=8,0) при 45°C в течение 2-5 часов. Выделение ДНК проводится общепринятым способом фенол-хлороформной экстракции и с последующей преципитацией изопропанолом. При необходимости дополнительная очистка ДНК от примеси белка выполняется из DB-буфера за счет его преципитации равным объемом 8М раствором ацетата аммония с

последующим осаждением ДНК из супернатанта изопропанолом. ДНК отмывается 70% этанолом, высушивается и растворяется в 50-200 мкл TE-буфера.

Выделение суммарной РНК проводится с использованием TRIreagent или любого набора. Очищенная РНК растворяется в стерильной воде, измеряется концентрация и чистота РНК на спектрофотометре и немедленно замораживается на -80°C . кДНК синтезируется из РНК обратной транскрипцией с использованием рандом-праймеров или Oligo-dT и обратной транскриптазы. Для синтеза используется объем РНК, содержащий 1мкг РНК. После отжига с праймерами/олиго-dT в течение 5 минут при 70°C , аликвота РНК вносится в смесь для обратной транскрипции с 10 единиц/мкл обратной транскриптазы и инкубируется при 37°C в течение одного часа.

3. Выявление внутригенных делеций в локусе IKZF1 методом традиционной ПЦР

При ОЛЛ возможны различные генетические поломки в локусе IKZF1 (Ikaros), но наиболее широко распространенными являются внутригенные делеции, включающие 3-6 кодирующий экзон (4-7 экзон мРНК) и 1-6 кодирующий экзон (2-7 экзон мРНК) (рисунок 1).

Поскольку точки разрыва могут происходить со смещением на сотни нуклеотидов, праймеры для ПЦР-амплификации были подобраны на достаточно большом расстоянии от наиболее частых точек хромосомных разрывов. Таким образом, амплифицированный фрагмент при делеции составляет от 1500 до 1600 п.н. Праймеры показаны в таблице 1. В качестве матрица для ПЦР используется геномная ДНК из моноклеарной фракции клеток костного мозга при презентации лейкоза.



Рисунок 1 – Два наиболее типичных варианта делеций в локусе IKZF1 при ОЛЛ. Примечание: нумерация экзонов включает первый, нетранслируемый экзон.

Таблица 1 – нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР анализа делеций ΔEx3-6 и ΔEx1-6. Обратный (R) для обеих делеций общий.

Для делеции ΔEx3-6	
ΔEx3-6_F	CCACAGGGCAAGTCATCCACATTTTG
ΔEx3-6_R	CAGACCATAGAGTCCCTCCTAGGGGAAAAA
Для делеции ΔEx1-6	
ΔEx1-6_F	TTCCTCCTCTAATCTTTGGACTTG
ΔEx1-6_R	CAGACCATAGAGTCCCTCCTAGGGGAAAAA

ПЦР выполняется в объеме 30мкл, содержащем 1,5мМ MgCl₂, 0,2мМ дНТП, 12,5 пмоль каждого из двух праймеров, и 1U Taq-полимеразы. Протокол реакции включает 35 циклов: 95°C – 30 сек., 62°C – 30 сек., 72°C – 1 мин., в завершении однократный прогрев 72°C – 5 мин.

ПЦР продукты разделяются в 1,5% агарозном геле, окрашиваются этидиум бромидом и фотографируются с помощью документирующей системы. В качестве положительного контроля используется позитивный образец ДНК пациента. При оценке продуктов ПЦР анализа в агарозном геле, положительным результатом является наличие полосы ДНК размером 1500-1600 п.н., соответствующей положительному контролю (рисунке 2).

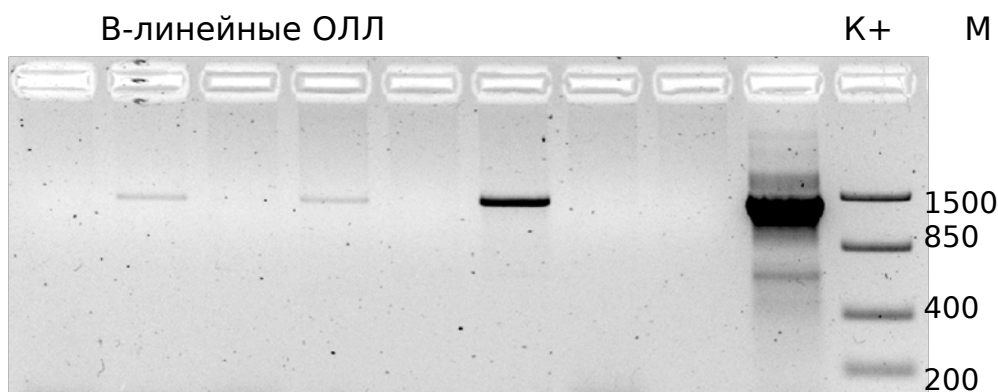


Рисунок 2 – ПЦР анализ делеции $\Delta Ex3-6$ гена IKZF1.

Возможно обнаружение тонкой полосы положительного продукта (рисунок 2). Такой результат является положительным, но означает наличие делеции в гене IKZF1 в минорных субпопуляциях лейкозного клона (следует учитывать процент бластных клеток в образце биопсии). Для количественного определения процента клеток, содержащих делецию, Полученный ПЦР продукт при необходимости можно секвенировать с использованием те же праймеров для точной локализации точки разрыва ДНК.

4. Выявление внутригенных делеций в локусе IKZF1 методом RQ-PCR

Метод RQ-PCR позволяет выявлять те же два варианта делеций, а также оценивать количество клеток с делецией относительно общего количества клеток по значению начала роста амплификационной кривой (Ct). Поскольку в данном методе амплифицируется небольшой фрагмент ДНК, а место разрыва ДНК при делеции варьирует в некотором диапазоне, предлагается несколько вариантов праймеров с флуоресцентно-мечеными TaqMan-пробами (таблица 2). В качестве матрица для ПЦР используется

геномная ДНК из мононуклеарной фракции клеток костного мозга при презентации лейкоза.

Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности праймеров для RQ-PCR анализа делеций ΔEx3-6 и ΔEx1-6. Прямой праймер обозначен как F, обратный R, проба ТМ.

Для делеции ΔEx1-6 (1 пара праймеров)	
F-İKZF1-A	CCTTTGAAGCTTACAAGAAGAGAAA
R-İKZF1-C	CCTTGAAGAAGAAACAGTTACACTAGACT
ТМ-İKZF1-A	FAM-TTGCTCAAAAAGGGCACATGTAC-BHQ
Для делеции ΔEx3-6 (2 пара праймеров)	
F-İKZF1-B	TCTTAGAAGTCTGGAGTCTGTGAAGGT
R-İKZF1-B	AGGAATAAAATGCAAATCACCTTGA
ТМ-İKZF1-C	FAM-AATTGACGGCATCCAGGGATCTCAGA-BHQ
Для делеции ΔEx3-6 (3 пара праймеров)	
F-İKZF1-C	CCCAGCCCATAGGGTATAAATAAT
R-İKZF1-C	CCTTGAAGAAGAAACAGTTACACTAGACT
ТМ-İKZF1-C	FAM-AATTGACGGCATCCAGGGATCTCAGA-BHQ
Контрольный ген альбумина	
Albumin1	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT
Albumin2	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
Albumin-ТМ	FAM-TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA-BHQ

Все ТМ-пробы помечены флуоресцентными метками FAM (5') и BHQ (3'). Реакция выполняется в объеме 20 мкл с готовым 2X супермиксом. В реакцию вносится 500 нг геномной ДНК, по 10 пмоль каждого праймера и 3 пмоля ТМ-пробы. Как правило, раскапывается по 15 мкл смеси ПЦР и в нужные лунки (пробирки) вносится 5 мкл образца ДНК концентрацией примерно 100 нг/мкл. Условия ПЦР реакции выполняются согласно инструкции набора супермикса и прибора для RQ-PCR. Амплификация проводится 60 циклов, каждый включает 95°C – 15 сек., 62°C – 1 мин. Фиксация уровня флуоресценции выполняется на стадии элонгации (62°C). Реакция выполняется в триплетах для каждой пары праймеров, независимо,

включая контрольный ген альбумина. В качестве отрицального (неспецифического) контроля используется ДНК из ПК здорового донора. При правильном выполнении методики пары праймеров 1-3 с ДНК донора не дает амплификации вообще или случайное повышение кривой после 50 цикла. Контрольная пара праймеров должна давать амплификацию на 19-24 цикле для любого образца ДНК человека.

Количественная оценка содержания клеток с делецией IKZF1 рассчитывается методом ΔC_t . Для этого определяется разница (ΔC_t) в значении среднего по триплету C_t контрольного гена (ABL) и среднего по триплету C_t измеряемой мишени (IKZF1 делеции), а относительное содержание клеток с делецией относительно всех ядродержащих в образце определяется как $2^{-\Delta C_t}$. Уровень от 1 до 10^{-4} свидетельствует, что в образце КМ низкое содержание бластов, или делеция происходит в субклоне лейкозных клеток. В этом случае целесообразно мониторировать эту мишень на этапах лечения для предотвращения рецидива.

5 Экспрессия коротких, доминантно-негативных изоформ гена IKZF1

5.1 RQ-PCR анализ экспрессии изоформ Ikaros

Белок Ikaros, продукт гена IKZF1, включает два отдельных домена со структурами «цинковых пальцев»: 4 ДНК-связывающих цинковых пальца N-конца и 2 цинковых пальца для белок-белковых взаимодействий около C-конца. Ген IKZF1 включает семь экзонов и транскрибируется в виде по меньшей мере 14 различных изоформ по средствам альтернативного сплайсинга с использованием альтернативных экзонов (рисунок 2).

Длинные изоформы, Ik1, Ikx, Ik2, и Ik3, которые содержат по меньшей мере три «цинковых пальцев» в ДНК-связывающем домене, сохраняют высокоаффинное ДНК-связывание и локализуются в ядре.

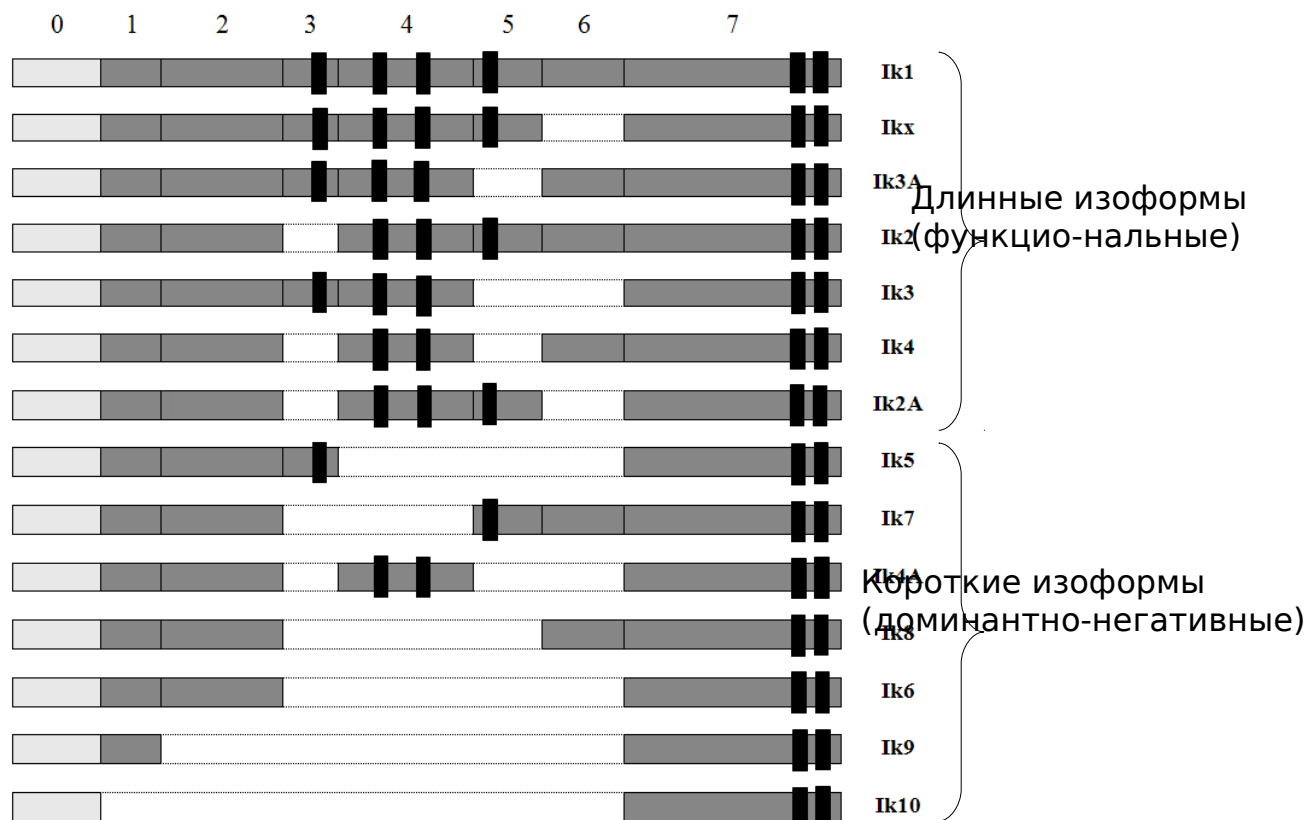


Рисунок 2 – Схематическое представление транскриптов гена IKZF1. Мотивы «цинковые пальцы» обозначены черными полосами.

Изоформы Ik4 – Ik10, которые имеют менее трех «цинковых пальцев», теряют свою ДНК-связывающую активность и локализуются в цитоплазме. Такие изоформы сохраняют способности образовывать гетеродимеры с полными изоформами, что приводит к потере их транскрипционной активности, поэтому они получили название доминантно-негативных изоформ (DN-Ik). Клинические испытания показали, что диагностическое значение при лейкозах имеет сверхэкспрессия коротких изоформ Ik6, 9, 10.

В настоящей инструкции приводятся праймеры и пробы для RQ-PCR анализа экспрессии 9 длинных и коротких изоформ Ikaros для полной характеристики профиля экспрессии этого гена. Для каждой изоформы подобрана своя пара праймеров и проба, также как и для контрольного гена тирозин-киназы Абельсона (ABL) (не путать с контрольным геном для ДНК-

анализа – альбумином (ALB!). Комбинации праймеров и их нуклеотидные последовательности приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Комбинации праймеров, зондов и красителей, используемых для RQ-PCR анализа экспрессии изоформ Ikaros. Примечание: Значение экспрессии изоформы Ikaros 3/3A вычисляется как разница между значением, полученным с указанной парой праймеров и значением экспрессии Ik1.

Транскрипт	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд (TM-probe)	Флуоресцентная метка
ABL	abl1	abl2	abl_TM	FAM
Ikaros 1,x	Ik-Ex3-3'F	Ik-Ex5-5'R	Ik-Ex4_TM	JOE
Ikaros 1,x,3, 3A*	Ik-Ex3-3'F	Ik-Ex4-3'R	Ik-Ex4_TM	JOE
Ikaros 2, 2A	Ik-Ex2-3'F	Ik-Ex5-5'R	Ik-Ex4_TM	JOE
Ikaros 4	Ex2/4_Ik4_F	Ex6/4_Ik4_R	Ik-Ex4_TM	JOE
Ikaros 6	Ik6_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX
Ikaros 5	Ik5_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX
Ikaros 8	Ik8_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX
Ikaros 9	Ik-Ex1/7_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX
Ikaros 10	Ik-Ex0/7_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX

Рекомендуется использовать три разных красителя (FAM, JOE, ROX) для контрольного гена, длинных и коротких изоформ Ikaros, что позволит избежать влияния неспецифической амплификации. Для этого требуется калибровка прибора на три длины волны. В случае одноканального прибора, возможно использование одного красителя FAM для всех трех зондов.

Олигонуклеотид	Последовательность
ABL-1	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
ABL-ТМ	FAM-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-BHQ
ABL-2	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
Ik-Ex3-3'F	GGTTCACAAAAGAAGCCACAC
Ik-Ex5-5'R	TAGCTTCGGCCACAATATCC
Ik-Ex4-3'R	GGAGTGCGTCCTCAGGTG
Ik-Ex2-3'F	AGAGTGACAGAGTCGTGGGAGA
Ik-Ex4-5'F	ATTCACCCAGAAGGGCAAC
Ik-Ex4_ТМ	JOE-AGCCCTTCAAATGCCACCTCTGCAAC-BHQ
Ik-Ex2/4_Ik4_F	AGAGTGACAGAGTCGTGGGAGA
Ik-Ex6/4_Ik4_R	TTTCTTCTTTAATGACGGAGTGC
Ex7-5'R	AGCTGGCGCTGCTGTCGT
Ex7-5'ТМ	ROX-CAAGGGCCTGTCCGACACGCC-BHQ
Ik5_F	CACAAAAGAAGCCACACTGGG
Ik6_F	AAGAGTGACAGAGTCGTGGGGA
Ik8_F	AGAGTGACAGAGTCGTGTCATTAAG
Ik-Ex1/7_F	AAGACATGTCCCAAGTTTCAGGGG
Ik-Ex0/7_F	GCGCGACGCACAAATCCACGG

Таблица 4 – Комбинации праймеров, зондов и красителей, используемых для RQ-PCR анализа экспрессии изоформ Ikaros.

В качестве материала для анализа используется кДНК, полученная из РНК лейкозных клеток. Для каждой мишени один образец кДНК амплифицируется в дуплетах. Рассчитывается среднее арифметическое порогового уровня амплификации (Ct) между дуплетами – mean Ct. После чего рассчитывается разница между mean Ct для контрольного гена ABL и измеряемой мишени – ΔCt . Относительный уровень экспрессии каждой мишени определяется как $2^{\Delta Ct}$. Полученная величина указывает уровень экспрессии мишени (изоформы Ikaros), относительно контрольного гена ABL, принятого за единицу.

5.2 Профиль экспрессии изоформ Ikaros в нормальных клетках

Ген IKZF1 экспрессируется в нормальных лимфоидных клетках костного мозга и других тканей, однако соотношение уровня экспрессии разных изоформ резко отличается в норме и при некоторых лейкозах. Для нормальных лимфоцитов свойственна относительно высокая (на уровне контрольного гена ABL или выше) экспрессия длинных изоформ (Ik1, Ikx, Ik2, Ik3), и на порядок более низкая экспрессия коротких изоформ (Ik4-9). Самая короткая изоформа, Ik10, в норме не экспрессируется вообще. Нормальный диапазон экспрессии изоформ Ikaros в контрольных образцах здоровых доноров костного мозга и периферической крови представлен в таблицах 5,6, а также на рисунке 3.

Таблица 5 – Уровни экспрессии изоформ Ikaros в нормальном костном мозге

	Ik1	Ik3	Ik2	Ik4	Ik5	Ik8	Ik6	Ik9	Ik10
25th% персентиль	0,39	0,49	0,79	0,06	0,014	0,02	0,0058	0,007	0
75th% персентиль	0,93	1,61	3,27	0,15	0,048	0,034	0,04	0,025	0,002
медиана	0,47	1,01	1,75	0,1	0,027	0,024	0,0076	0,014	<10 ⁻⁶

Таблица 6 – Уровни экспрессии изоформ Ikaros в периферической крови

	Ik1	Ik3	Ik2	Ik4	Ik5	Ik8	Ik6	Ik9	Ik10
25th% персентиль	0,6	2,00	0,65	0,06	0,002	0,01	0,031	0,013	0
75th% персентиль	2,06	3,84	2,52	0,22	0,009	0,03	0,12	0,06	0
медиана	1,25	2,35	1,52	0,14	0,005	0,025	0,07	0,024	0

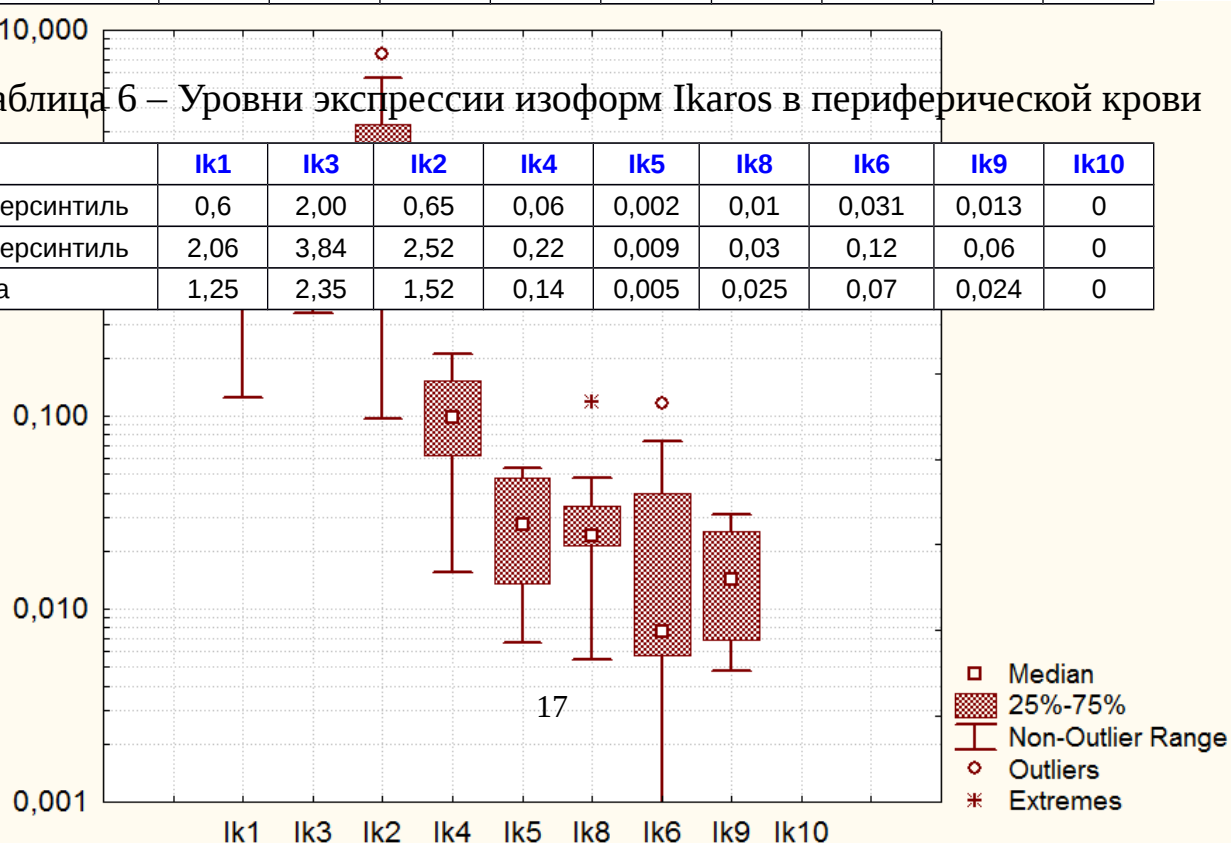


Рисунок 3 – Профиль экспрессии изоформ Ikaros в клетках здорового костного мозга.

5.3 Аберрантная экспрессия изоформ Ikaros у больных ОЛЛ

Нарушения сплайсинга в опухолевых лейкозных клетках приводит к аберрантной экспрессии некоторых изоформ Ikaros. Нарушения могут носить качественный и количественный характер. Количественные изменения экспрессии на сегодняшний день плохо изучены и их клиническое значение не известно. Качественные изменения представляют собой резкое увеличение (сверхэкспрессия) или снижение (отсутствие) экспрессии какой-то изоформы. Наиболее характерным качественным нарушением экспрессии Ikaros является сверхэкспрессия коротких изоформ Ik6, Ik9 и Ik10 (рисунок 4).

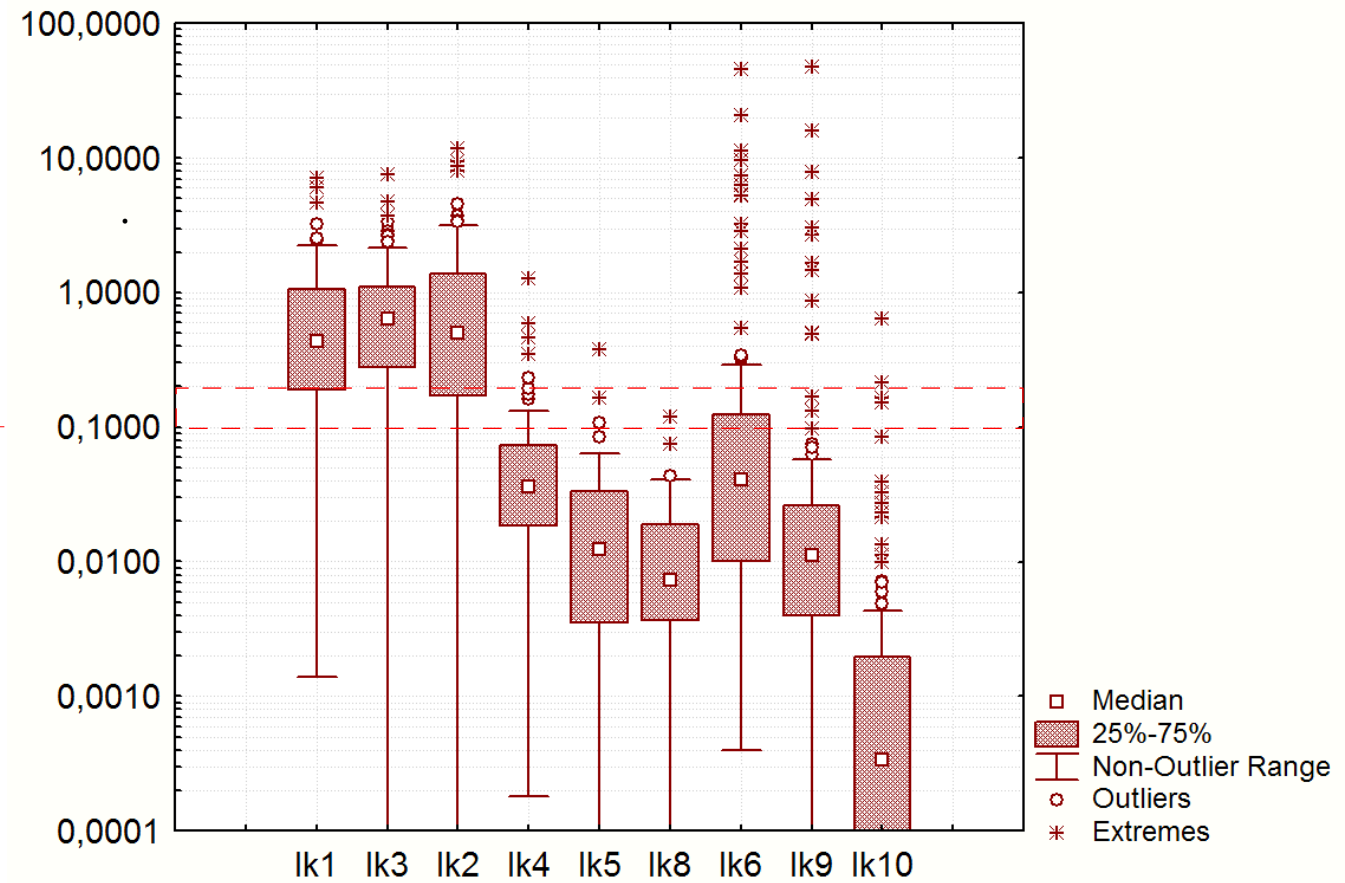


Рисунок 4 – Профиль экспрессии изоформ Ikaros в костном мозге больных ОЛЛ. Пороговые уровни для сверхэкспрессии Ik6 – **0,2** и для Ik9 и Ik10 – **0,1**, обозначены пунктирными линиями.

В качестве порогового критерия, отделяющего нормальный уровень экспрессии Ik6 от aberrантного, было определено значение 0,2, для изоформы Ik9 – 0,1 от значения контрольного гена ABL. Значения экспрессии Ik6 и Ik9 выше либо равные 0,2 или 0,1, соответственно, оцениваются как наличие сверхэкспрессии, ниже – как нормальный уровень.

Самая короткая изоформа Ik10 практически не экспрессируется в нормальных лимфоцитах. Поэтому, лейкоз оценивается как Ik10-позитивный, в случае воспроизводимой амплификации ранее 40 цикла с ΔCt в репликах (дуплете или триplete) ≤ 2 и значением большим, чем 0,1 контрольного гена ABL.

6 Интерпретация результатов анализа

Первые два метода – классическая ПЦР и количественная ПЦР «в реальном времени» равнозначны для диагностики двух наиболее распространенных делеций в гене IKZF1. Для верификации результатов рекомендуется использовать оба метода параллельно для всех образцов или в случае сомнительных результатов одного из методов.

Классическая ПЦР требует лучшего качества высокомолекулярной ДНК. В случае выделения ДНК из фиксированного материала, например, гематологических мазков или парафиновых блоков ткани амплификация большого фрагмента ДНК может быть затруднена.

Возможно положительный результат классической ПЦР и отрицательный – RQ-PCR. Две пары праймеров RQ-PCR для делеции ΔEx3-6 расширяют возможности метода, однако есть вероятность ложноотрицательных результатов. В случае положительного результата классической ПЦР и отрицательного RQ-PCR приоритет имеет первый метод. Подобные ограничения связаны с тем, что точки разрыва могут выходить за пределы небольшого фрагмента, амплифицируемого праймерами для RQ-PCR. Секвенирование фрагмента, полученного классической ПЦР позволяет идентифицировать точку разрыва и определить подходящее расположение праймеров.

Третий метод, RQ-PCR анализ транскрипционных изоформ гена IKZF1 (Ikargos) на уровне РНК (кДНК) позволяет оценить функциональное состояние гена IKZF1. Как правило, сверхэкспрессия коротких, доминантно-негативных (Ik-DN) изоформ Ik6, Ik9, Ik10 является следствием различных делеций внутри гена. Изоформы Ik6 и Ik9 обычно сопряжены с делецией ΔEx3-6, Ik10 – проявление делеции ΔEx1-6. В некоторых случаях, однако, сверхэкспрессия коротких изоформ проявляется в отсутствии соответствующих делеций. В таких случаях, результаты следует

интерпретировать по принципу дополнительности: aberrантный статус гена в случае хотя бы одного события, делеции или I_k-DN экспрессии. Анализ экспрессии изоформ существенно расширяет диагностические возможности, поскольку большое разнообразие редких делеций, не выявляемых непосредственно ПЦР, проявляются в указанных нарушениях сплайсинга.

7 Перечень возможных осложнений и ошибок в выполнении метода и пути их устранения

Проблема: Отсутствует амплификация положительного контроля делеции ΔEx3-6 или ΔEx1-6.

Причина: 1. Недостаточное качество ДНК. 2. Фрагментация ДНК.

Решение: 1. Использовать контрольную ПЦР-амплификацию с любой парой праймеров к гену «домашнего хозяйства» (альбумин, актин и др.), предпочтительно с большой длиной фрагмента. Оптимизировать ПЦР по контрольному гену. Проверить ДНК образцов на спектрофотометре, убедиться, что ДНК чистая. 2. Использовать второй метод, RQ-PCR анализ делеций IKZF1.

Проблема: При RQ-PCR анализе экспрессии изоформ I_{karos} амплификация контрольного гена ABL проходит нормально, а изоформ I_{karos} – не удовлетворительно.

Причина: Неправильное приготовление реакционной смеси или разведение праймеров.

Решение: Повторить анализ с включением проверенного образца кДНК от другого пациента или клеточной линии с той же самой реакционной смесью. Приготовить повторно супермикс. Если контрольная амплификация проходит успешно, результат низкой или отрицательной экспрессии следует интерпретировать как отрицательный результат анализа.