

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

« 28 » _____ 2015 г.

Регистрационный № 093-1015

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ
У ДЕТЕЙ С MLL-ПОЗИТИВНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

К.б.н. Кустанович А.М., Волочник Е.В., д.м.н., профессор, член-корр. НАН
Беларуси Алейникова О.В.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод пациент-специфичного определения минимальной остаточной болезни у детей с *MLL*-позитивным лейкозом, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с лейкозом.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-гематологов, врачей-педиатров, врачей-трансплантологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим острым лейкозом.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острый лимфобластный лейкоз детей, острый миелоидный лейкоз детей.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

МЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ

Термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени.

Центрифуга с охлаждением для пробирок объемом 15-50 мл.

ПЦР бокс.

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Вортекс.

Водяная баня.

Генетический анализатор для проведения капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза.

Инкубатор для клеточных культур с 5% CO₂

Камера Горяева.

Магнитная мешалка с подогревом.

Морозильник -20°C .

Спектрофотометр.

Термомиксер.

Микроскоп флуоресцентный с увеличением до 1000х.

Холодильник.

Центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин (объем пробирок 1,5-2 мл).

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

мкл.

РЕАКТИВЫ

KCl.

MgCl₂.

NP40.

RPMI-1640.

SSC.

ДТТ.

Тақ ДНК полимераза.

Агароза.

Бромистый этидиум.

Вода деионизованная.

Зонды на разрыв гена *MLL* состоят из двух частей размером не менее 100 килобаз каждая, меченых разными флуорохромами и расположенных по обе стороны от точки разрыва в гене *MLL*.

Имерсионное масло для флуоресцентной микроскопии.

Изопропанол.

Ингибитор РНКаз.

Колцеид.

2х мастер микс для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой.

Маркер молекулярного веса.

Метанол.

Набор для выделения РНК.

Набор для секвенирования, содержащий флуоресцентно-меченые дидезоксинуклеотиды.

Обратная транскриптаза.

Олигонуклеотиды.

Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ).

Раствор красителя Гимза.

Раствор DAPI.

Резиновый (каучуковый) клей.

Рэндом гексамеры.

Трипсин.

Уксусная кислота, ледяная.

Уксусная кислота, 10%/

Фенол-содержащий реагент для выделения РНК, рН 4,0.

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

Формальдегид 3,7%/ФСБ.

Фосфатно-солевого буфер (ФСБ).

Хлороформ.

ЭДТА, 0,125М, рН 8,0.

ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка).

Этанол, 70%.

Этанол, 80%.

Этанол, 96%.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Раствор, содержащий пенициллин (10000 ед./мл)/ стрептомицин (10 мг/мл)/ амфотерицин В (25 мкг/мл) (далее – антибиотик-антимикотик).

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

Покровные стекла.

Предметные стекла.

Пробирки (объем - 0,2-50 мл).

Пробирки с антикоагулянтом (гепарином Na сухого распыления для цитогенетических исследований).

Пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом натрия для молекулярно-биологических исследований).

Серологические пипетки (объем – 5 - 20 мл).

Флаконы для культивирования клеток, 50 мл.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

FISH – флуоресцентная in situ гибридизация

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплиментарная ДНК

КМ – костный мозг

КТ – комнатная температура

МНК – моноклеарные клетки

МОБ – минимальная остаточная болезнь

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ПК – периферическая кровь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Скрининг образцов с лейкозом на наличие перестроек гена *MLL* с использованием цитогенетических методов.

1.1. выделение клеток;

1.2. приготовление культуры клеток;

1.3. фиксация культур;

1.4. приготовление препаратов;

1.5. методика дифференциального окрашивания хромосом; (G-окрашивание).

1.6. методика флуоресцентной *in situ* гибридизации.

2. Скрининг образцов с лейкозом на наличие перестроек гена *MLL* с использованием ПЦР.

2.1. выделение моноклеарных клеток;

2.2. выделение суммарной РНК;

2.3. обратная транскрипция;

2.4. мультиплексная полимеразная цепная реакция;

2.5. электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле;

2.6. интерпретация результатов анализа.

2. Определение минимальной остаточной болезни у пациентов с перестройкой гена *MLL*.

3.1 определение минимальной остаточной болезни у пациентов с экспрессией *MLL-AF4*;

3.1.1. оценка качества ПЦР;

3.1.2. оценка уровня экспрессии и определение минимальной остаточной болезни при анализе с использованием абсолютного количественного определения экспрессии генов;

3.2. определение минимальной остаточной болезни у пациентов с экспрессией *MLL-AF9*, *MLL-ENL*;

3.2.1. оценка уровня экспрессии и определение минимальной остаточной болезни при анализе с использованием полуколичественного определения экспрессии генов;

3.3. определение минимальной остаточной болезни у пациентов с экспрессией *MLL-AF6*, *MLL-AF10*, *MLL-ELL*.

1. Скрининг образцов с лейкозом на наличие перестроек гена *MLL* с использованием цитогенетических методов

Для выявления перестроек гена *MLL* методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) используют зонды на разрыв гена. В зондах 5` конец и 3` конец гена метятся разными флуорохромами, что позволяет визуально определить наличие/отсутствие перестройки. В клетках с нормальным кариотипом видны два слитных сигнала, с аберрантным - один слитной сигнал и по одному сигналу, соответствующему, каждой из частей проб. Отсутствие одного из сигналов, или наличие дополнительного сигнала бывает при несбалансированных транслокациях или дополнительных дериватных хромосомах в кариотипе.

Для исследования лейкозных клеток на момент постановки диагноза анализируют 100 интерфазных ядер. При определении минимальной остаточной болезни – анализируют минимум 1000 интерфазных ядер. Исследуемые ядра должны иметь четкие границы, быть равномерно окрашенными и лежать изолировано. Сигналы также должны быть достаточно яркими, четкими (не диффузными). Позитивным считают расположение сигналов более чем на два диаметра сигнала (в слитных сигналах возможен небольшой разрыв между сигналами от разных флуорохромов за счет неокрашенного участка между 5` и 3` окрашенными концами).

Для приготовления препарата используют культуру клеток фиксированных в смеси метанол-уксусная кислота в соотношении 3:1 (фиксатор Карнуа).

1.1 Выделение клеток

2-3 мл КМ вносят в пробирку с гепарином. Клетки выделяют путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077 г/мл 20 минут при 2200 об/мин. После центрифугирования кольцо мононуклеарных клеток переносят в чистую пробирку и клетки отмывают 1-2 раза в 10 мл среде RPMI-1640, центрифугируя 10 минут при 1500 об/мин. Отбирают надосадочную жидкость, оставляя 1-1,5 мл и подсчитывают концентрацию клеток в камере Горяева.

1.2 Приготовление культуры клеток

В предварительно нагретую полную среду RPMI-1640 (10% ЭТС, глютамин, антибиотик-антимикотик) добавляют клетки в концентрации $1,5 \times 10^6$ для ОЛЛ и $2,0 \times 10^6$ для ОМЛ. Перемешивают легким покачиванием и помещают в инкубатор с 5% CO₂ на 24 часа.

1.3 Фиксация культур

Во флакон с культурами клеток добавляют колцемид, перемешивают и помещают в инкубатор (37°C, 30 минут). Содержимое флакона переносят в чистую пробирку и центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин. Осадок ресуспендируют, добавляют 8 мл 0,55% KCl и помещают на водяную баню (37°C, 10 мин). Затем центрифугируют (10 минут, 1500 об/мин), осадок ресуспендируют, разводя фиксатором Карнуа до 10 мл, помещают в морозильник (-20°C, 20 минут). Клетки центрифугируют (10 минут, 1500 об/мин), осадок ресуспендируют, заливают свежим фиксатором Карнуа и помещают в холодильник (+5°C) на хранение до раскапывания.

1.4. Приготовление препаратов клеток

Перед приготовлением препарата клеток готовят свежий фиксатор Карнуа, отмывают клетки и помещают их в свежий фиксатор Карнуа. Затем клетки осаждают, отбирают супернатант, раскапывают материал. Для FISH-исследования раскапывание производят с небольшой высоты на сухое,

предварительно обезжиренное стекло. Для получения качественных препаратов для G-окрашивания или FISH-окрашивания на целую хромосому раскапывание происходит на водяной бане (56°C) на мокрое стекло с высоты 10-15 см. После высыхания препарата оценивают качество и количество метафазных пластинок при помощи микроскопа.

1.5. Методика дифференциального окрашивания хромосом (G-окрашивание)

Раскапанные стекла сушат несколько часов при комнатной температуре (КТ) и помещают на двое суток в термостат (56°C). Затем стекла достают и остужают при КТ. Далее стекла инкубируют 7-10 секунд в 0,05% растворе трипсина, помещают в ледяной ФСБ на 1 минуту и в 5% раствор красителя Гимза на 6-7 минут (время для каждого препарата подбирается индивидуально). Окрашенные препараты промывают дистиллированной водой и сушат при КТ. Анализ проводится под световым микроскопом при общем увеличении 1000.

1.6. Методика флуоресцентной *in situ* гибридизации

1. Стекла помещают в 3,7% формальдегид/ФСБ на 2 минуты.
2. Отмывают стекла в 2xSSC в течение 30 минут при 37°C.
3. Дегидратируют образцы в серии спиртов (70, 80 и 96 % этаноле) по 2 минуты при КТ и сушат стекла вертикально при КТ.
4. В обозначенную зону интереса наносят ДНК-зонд, накрывают покровным стеклом и заклеивают края клеем.
5. ДНК денатурируют при температурах, указанных производителем в течение 5 минут, и гибридизуют при температурах, указанных производителем в течение 16-20 часов во влажной камере.
6. Покровные стекла снимают и отмывают в растворе 0,4xSSC/0,3% NP40 в течение 2 минут при температурах, указанных производителем.
7. Стекла выдерживают 10 минут в 2xSSC/0,1% NP40 при КТ.
8. Дегидратируют образцы в серии спиртов (70, 80 и 96 % этаноле) по 2 минуты при КТ. Затем сушат стекла вертикально при КТ в темноте.
9. Наносят рабочий раствор DAPI, накрывают покровным стеклом и анализируют полученный результат под флуоресцентным микроскопом с соответствующими фильтрами.

2. Скрининг образцов с лейкозом на наличие перестроек гена *MLL* с использованием ПЦР

2.1. Выделение моноклеарных клеток (МНК)

5 мл КМ (ПК) наслаивают на 1 объем градиента плотности 1,077 г/мл, находящегося при комнатной температуре и центрифугируют при комнатной температуре в течение 30 минут при 400 g. Слой МНК переносят в чистую пробирку, дважды отмывают в ФСБ (250 g, 10 минут), клетки ресуспендируют в соответствующем объеме ФСБ.

2.2. Выделение суммарной РНК

Внимание! Использование недеградированной цельной РНК является обязательным условием для проведения диагностического ПЦР анализа.

Осадок, содержащий $5-10 \times 10^6$ бластных клеток (количество клеток определяют в камере Горяева с использованием 10% уксусной кислоты), лизируют в 1 мл фенол-содержащего реагента для выделения РНК. Лизат оставляют на 5 минут при комнатной температуре для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов, после чего его либо замораживают при -20°C , либо используют непосредственно для экстракции РНК. РНК выделяют с использованием фенол-содержащего реагента для выделения РНК в соответствии с инструкциями производителя. Для выделения РНК подходит любой иной способ или коммерческий набор, обеспечивающие надлежащее качество РНК.

Качество и количество РНК оценивают спектрофотометрически и электрофоретически. При этом оценивают примесь белков по соотношению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм (для нуклеиновых кислот) и 280 нм (для белков) (260/280) и примесь углеводов по соотношению 260/230 нм. Образец суммарной РНК считают чистым при значении показателей более 1,8. Качество РНК оценивают также визуально после электрофореза 5 мкл РНК в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым

этидиумом: в случае качественной РНК флуоресценция в лунке (примесь ДНК) и конце (деградированная РНК) дорожки отсутствует, а интенсивность полосы 18S рибосомальной РНК примерно в два раза выше, чем полосы 16S рРНК.

2.3. Обратная транскрипция

Для синтеза кДНК подходит любой набор, обеспечивающий эффективный синтез кДНК. 100 нг – 1 мкг тотальной РНК смешивают с 50-250 нг рэндом гексамеров, 1 мкл 2,5 мМ дНТФ, и водой до объема 13 мкл и инкубируют 5 минут при 65⁰С. Охлаждают на льду не менее минуты, осаждают конденсат со стенок и добавляют остальные реагенты до конечного объема 20 мкл: 4 мкл 5х буфера, 1 мкл 0.1 М ДТТ, 1 мкл ингибитора РНКаз (40 единиц/мкл), 1 мкл обратной транскриптазы, которая работает при 50-55⁰С (200 единиц/мкл). Инкубируют последовательно при комнатной температуре 5 минут, при 50⁰С в течение 30-60 минут, 70⁰С в течение 15 минут. Помещают образец на 4⁰С. В полученную кДНК добавляют 30 мкл воды, кДНК используют непосредственно в ПЦР или замораживают при -20⁰С.

2.4. Мультиплексная полимеразная цепная реакция

Внимание! Качество полученной кДНК является критичным параметром для выполнения методики. Использование некачественной кДНК и/или кДНК, полученной из деградированной РНК или РНК, содержащей ингибиторы, может привести к ложноотрицательным результатам.

Смеси для ПЦР необходимо разделить на аликвоты и хранить при температуре не выше -18⁰С. Все процедуры выполняют на льду.

Для определения генов *MLL-AF4*, *MLL-AF6*, *MLL-AF9*, *MLL-AF10*, *MLL-ENL*, *MLL-ELL* используют метод описанный Andersson A et al. (2001).

Таблица 1 – Последовательности праймеров для определения молекулярно-генетических изменений в реакционной смеси М1

Наименование	Последовательность	Ген
--------------	--------------------	-----

3759U	cccaaagaaaagcagtagtga	MLL
1607L	ttagtagggaaaggaaacttg	AF4
439L	ttccgatcatctttgttc	AF6
1825L	gattgctttgctttattgg	AF9
1049L	ctgttctatgctggctgcta	AF10
2366L	ctggttgatcatagcgaatc	AF10
247L	gcttccttgaaatcgatag	ELL
216L	cgtacccccgactccttact	ENL
1399L	gcctgacaccttgctgtt	ENL

Состав реакционной смеси готовят в соответствии с прописью, указанной в таблице 3. Реакционную смесь инкубируют 5 минут при 95⁰С, затем проводят 35 циклов ПЦР (95⁰С – 30 секунд, 60⁰С – 30 секунд, 72⁰С – 60 секунд), окончательная элонгация продуктов ПЦР – 5 минут при 72⁰С.

Таблица 2 – Последовательности праймеров для определения молекулярно-генетических изменений в реакционной смеси М2

Наименование	Последовательность	Ген
3920U	ctcagccacctactacaggac	MLL
1569L	ttaggttttgggttacagaac	AF4
351L	gataacccttcttttcctg	AF6
1645L	agcgagcaaagatcaaatc	AF9
1017L	cctggaaattgcattttaa	AF10
2316L	tctccaagcgcttcaat	AF10
170L	ccgatgttgagaggtagaa	ELL
91L	ggacaaacaccatccagtc	ENL
1327L	ggcgctgtgtcactctc	ENL

Таблица 3 – Состав реакционной смеси для проведения мультиплексной ПЦР

M1		M2	
	мкл		мкл
5x ПЦР буфер	5,5	5x ПЦР буфер	5,0
25 mM MgCl ₂	1,25	25 mM MgCl ₂	1,75
25 mM дНТФ	0,2	25 mM дНТФ	0,2
Тақ ДНК Полимераза (5 ед/мкл)	0,2	Тақ ДНК Полимераза (5 ед/мкл)	0,2
3759U*	0,125	3920U	0,125
1607L	0,125	1569L	0,125
439L	0,125	351L	0,125
1825L	0,125	1645L	0,125
1049L	0,125	1017L	0,125
2366L	0,125	2316L	0,125
247L	0,125	170L	0,125
216L	0,125	91L	0,125
1399L	0,125	1327L	0,125
Вода	До 25	Вода	До 25
кДНК	2-4**	кДНК	2-4**

*– Праймеры в концентрации 100 пмоль/мкл, **- 2-4 мкл (соответствует 40-80 нг РНК). Не более 10% от объема ПЦР реакции.

2.5. Электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле

10 мкл продуктов ПЦР смешивают с 2 мкл бромфенолового синего и вносят в лунки 1,5% агарозного геля, содержащего этидиум бромид. Электрофорез проходит в течение 45 минут при напряжении 150 В и силе тока 150 мА в аппарате для горизонтального электрофореза. Визуализацию проводят с использованием документирующей системы.

2.6. Интерпретация результатов.

При наличии полосы в одной или двух реакциях (M1 или M2), следует провести дополнительный анализ. Суть его заключается в том, что готовят 6 реакционных смесей в соответствии с прописью, указанной в таблицах 1 и 2 с той разницей, что в реакцию вносят праймер к гену *MLL* (3759U для M1 или 3920U для M2) и обратный(е) праймер(ы) для:

AF4: 1607L для M1 или 1569L для M2,

AF6: 439L для M1 или 351L для M2,
AF9: 1825L для M1 или 1645L для M2,
ELL: 247L для M1 или 170L для M2,
AF10: 1049L и 2366L для M1 или 1017L и 2316L для M2,
ENL: 216L и 1399L для M1 или 91L и 1327L для M2,
а также соответствующее количество деионизованной воды.

Реакция, в которой определяется полоса, будет указывать на соответствующий химерный ген, присутствующий у пациента – например, если полоса присутствует в реакции, соответствующей *MLL-AF9*, данный химерный ген присутствует в опухолевых клетках пациента.

В случае необходимости, подтвердить результат ПЦР можно с использованием альтернативных протоколов Beillard E et al. (2003), Gabert J et al. (2003), Jansen MWJC et al. (2005), путем прямого секвенирования продуктов ПЦР и/или с помощью ПЦР в реальном времени (см. следующий раздел).

В случае отрицательного результата ПЦР необходимо удостовериться в надлежащем качестве и количестве кДНК и возможности использовать кДНК в качестве матрицы для амплификации контрольных мишеней размером около 1000 пар оснований (размер некоторых вариантов анализируемых генов составляет более 1000 пар оснований). Если качество кДНК удовлетворительное, экспрессия анализируемых генов в исследуемом образце отсутствует.

Справочно, В бластных клетках потенциально могут присутствовать редкие варианты химерного гена, которые не выявляются с использованием описанных праймеров. Такое, впрочем, встречается крайне редко и может быть дополнительно проконтролировано с использованием описанных цитогенетических методов.

3. Определение минимальной остаточной болезни у пациентов с перестройкой гена *MLL*

После определения типа химерного гена необходимо подобрать праймеры для определения минимальной остаточной болезни с использованием ПЦР в реальном времени. Количественная интерпретация данных, полученных в ходе ПЦР в реальном времени требует 100% эффективности амплификации. Для этого праймеры следует подбирать таким образом, чтобы они амплифицировали фрагменты размером 50-150 пар оснований, ведь при увеличении длины амплифицируемого участка эффективность амплификации снижается. Это накладывает определенные ограничения на дизайн праймеров, не позволяет использовать праймеры, которые использовались для выявления химерных генов в качественной ПЦР и ограничивает спектр сплайс-вариантов, определяемых в ходе ПЦР. Поэтому для подбора праймеров и оценки минимальной остаточной болезни используются разные подходы в зависимости от типа химерного гена.

3.1. Определение минимальной остаточной болезни у пациентов с экспрессией *MLL-AF4*

Экспрессию гена *MLL-AF4* в ходе терапии целесообразно определять с использованием метода, описанного Gabert J et al. (2003). Для проведения реакции готовят реакционную смесь, содержащую 12,5 мкл 2х мастер микса для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой, 300 нМ праймеров (ENF207/ENR262 или ENF208/ENR262) и 200 нМ пробы ENP242, воды до 20 мкл и 5 мкл кДНК (общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл). Две реакции, содержащие исследуемую кДНК две реакции, содержащие воду (К-) и/или кДНК без экспрессии *MLL-AF4* вносят в оптические пробирки (можно использовать 96 луночный планшет или стрипы пробирок), тщательно закрывают оптическими крышками (оптической пленкой), осаждают и помещают в термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени. Реакционную смесь инкубируют 2 минуты при 50°C, 10 минут при 95°C, затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C – 15 секунд, 60°C – 60 секунд), считывание флуоресценции проводится на этапе элонгации.

Задача этого этапа – определить, какой вариант гена присутствует у пациента. В этом случае возможны несколько вариантов:

1) Присутствует ПЦР продукт в пробирке с ENF207/ENR262: в исследуемом образце лейкозных клеток присутствуют варианты e9-e5 или e9-e4. В дальнейшем используют комбинацию праймеров ENF207/ENR262 и пробы ENP242.

2) Присутствует ПЦР продукт в пробирке с ENF208/ENR262: в исследуемом образце лейкозных клеток присутствуют варианты e10-e5, e10-e4, e11-e4, e11-e5. В дальнейшем используют комбинацию праймеров ENF208/ENR262 и пробы ENP242.

3) Присутствует ПЦР продукт в обеих пробирках. В дальнейшем используют комбинацию праймеров и пробы, давшей наименьшее значение *St* (с использованием которой амплификация выявляется на более ранних циклах ПЦР).

После подбора оптимальной комбинации праймеров/пробы идет определение уровня минимальной остаточной болезни в ходе терапии. Для постановки ПЦР готовят реакционные смеси, содержащие необходимые реактивы для амплификации 8+2n пробирок в случае контрольного гена и 12+2n пробирки для амплификации искомого гена, где n – количество образцов, анализируемых с использованием выбранной комбинации праймеров. В качестве контрольного гена используют *ABL* (чаще) или *GUS* (таблица 4). Выбранный контрольный ген целесообразно использовать постоянно для данного типа химерных генов, предпочтительнее – для всех анализов, проводимых в лаборатории.

3.1.1. Оценка качества ПЦР

В результате ПЦР получают несколько типов данных – данные о цикле, на котором кривая амплификации пересекает пороговый уровень (threshold), так называемый пороговый цикл C_t , а также о количестве копий исследуемых молекул во внесенном материале при использовании стандартов.

Перед началом анализа необходимо убедиться в том, что параметры ПЦР позволяют получить качественные результаты – эффективность должна быть 100% (95-105%), тангенс угла наклона кривой составляет -3,32, коэффициент корреляции $R=0,995-1,005$.

В случае соответствия стандартной кривой заданным параметрам, оценивают разброс параметров C_t для контрольного (КГ) и исследуемого гена (ИГ), который в идеале не должен превышать 0,5 цикла. Следует также отметить, что экспрессия контрольного гена должна составить не менее 10000 копий гена, в C_t это составляет не более 26-29 циклов.

Таблица 4 – Последовательности олигонуклеотидов для оценки минимальной остаточной болезни у пациентов с перестройками гена *MLL-AF4*

Ген	Название	Последовательность	Метки
<i>MLL-AF4</i>	ENP242	catggccgcctcctttgacagc	FAM/BHQ
	ENF207	cccaagtatccctgtaaaacaaaa	
	ENF208	gatggagtccacaggatcagagt	
	ENR262	gaaaggaaacttggatggctca	
<i>ABL</i>	ENF1003	tggagataacactctaagcataactaaaggt	
	ENP1043	ccatttttggttgggcttcacaccatt	FAM/BHQ
	ENR1063	gatgtagtgttgggaccca	
<i>GUS</i>	ENF1102	gaaaatatgtggttggagagctcatt	
	ENP1142	ccagcactctcggtgactgttca	FAM/BHQ
	ENR1162	ccgagtgaagatcccctttta	

3.1.2. Оценка уровня экспрессии и определение минимальной остаточной болезни при анализе с использованием абсолютного количественного определения экспрессии генов

Для оценки уровня экспрессии усредненное количество копий ИГ разделяют на количество копий КГ на момент постановки диагноза. Полученное значение нормализованной экспрессии ИГ на момент постановки диагноза принимают за 100% и в дальнейшем с ним сопоставляют все последующие точки, выражая уровень минимальной остаточной болезни (МОБ) в процентах (%) от диагноза. Изменение уровня МОБ можно также выражать в логарифмах, когда 1 логарифму соответствует изменение в 10 раз.

Если качество кДНК низкое (например, менее 10000 копий гена Абельсон), и химерный ген не амплифицируется, ответ с использованием данного материала выдан быть не может по причине низкого качества или недостаточного количества материала. Рекомендуется также перевыделить РНК/пересинтезировать кДНК и повторить ПЦР.

Если качество кДНК низкое (например, менее 10000 копий гена Абельсон), и химерный ген амплифицируется, говорят, что экспрессия гена в образце присутствует, но количественно интерпретировать данные не представляется возможным с использованием данного материала. Рекомендуют также перевыделить РНК/пересинтезировать кДНК и повторить ПЦР.

В случае высокого качества материала, при отсутствии амплификации ИГ речь идет о том, что экспрессия изучаемого гена в исследованном образце не определяется или отсутствует.

3.2. Определение минимальной остаточной болезни у пациентов с экспрессией *MLL-AF9*, *MLL-ENL*

Определение экспрессии генов *MLL-AF9*, *MLL-ENL* проводят с использованием праймеров, указанных в таблице 5. В этом случае результаты ПЦР получаются полуколичественными.

На первом этапе определяют оптимальную комбинацию праймеров. Так, если диагностическая ПЦР выявила экспрессию гена *MLL-AF9*, для проведения реакции готовят реакционную смесь, содержащую 12,5 мкл 2х мастер микса для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой, 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы (*MLL-F1/MLL-T1/AF9-R1/AF9-R2/AF9-R3* и *MLL-F2/MLL-T2/AF9-R1/AF9-R2/AF9-R3*), воды до 20 мкл и 5 мкл кДНК (общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл). Реакцию, содержащую исследуемую кДНК и реакцию, содержащую воду и/или кДНК без экспрессии *MLL-AF9* (К-) вносят в оптические пробирки (можно использовать 96 луночный планшет или стрипы пробирок), тщательно закрывают оптическими крышками (оптической пленкой), осаждают и помещают в термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени. Реакционную смесь инкубируют 2 минуты при 50°C, 10 минут при 95°C, затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C – 15 секунд, 60°C – 60 секунд), считывание флуоресценции проводят на этапе элонгации.

После проведения ПЦР выбирают реакцию, дающую наименьшее значение *C_t*, то есть содержащую праймеры/пробы, наиболее подходящие для варианта транскрипта исследуемого гена. Задача этого этапа – определить, какой вариант гена присутствует у пациента. В этом случае возможны несколько вариантов:

1) ПЦР продукт определяется в пробирке с MLL-F1/MLL-T1/AF9-R1/AF9-R2/AF9-R3. На следующем этапе вносят исследуемый образец в пробирки, содержащие следующие комбинации праймеров/пробы

А) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R1;

Б) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R2;

В) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R3.

2) ПЦР продукт определяется в пробирке с MLL-F2/MLL-T2/AF9-R1/AF9-R2/AF9-R3. На следующем этапе вносят исследуемый образец в пробирки, содержащие следующие комбинации праймеров/пробы

А) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R1;

Б) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R2;

В) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R3.

Если диагностическая ПЦР выявила экспрессию гена *MLL-ENL*, для проведения реакции готовят реакционную смесь, содержащую 12,5 мкл 2х мастер микса для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой, 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы (MLL-F1/MLL-T1/ENL-R1/ENL-R2 и MLL-F2/MLL-T2/ENL-R1/ENL-R2), воды до 20 мкл и 5 мкл кДНК (общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл). Реакцию, содержащую исследуемую кДНК, реакцию, содержащую воду и/или кДНК без экспрессии *MLL-ENL* (К-) вносят в оптические пробирки (можно использовать 96 луночный планшет или стрипы пробирок), тщательно закрывают оптическими крышками (оптической пленкой), осаждают и помещают в термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени. Реакционную смесь инкубируют 2 минуты при 50°C, 10 минут при 95°C, затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C – 15 секунд, 60°C – 60 секунд), считывание флуоресценции проводят на этапе элонгации.

После проведения ПЦР выбирают реакцию, дающую наименьшее значение *C_t*, то есть содержащую праймеры/пробы, наиболее подходящие для варианта транскрипта исследуемого гена. Задача этого этапа – определить, какой вариант гена присутствует у пациента. В этом случае возможны несколько вариантов:

3) ПЦР продукт определяется в пробирке с MLL-F1/MLL-T1/ ENL-R1/ENL-R2. На следующем этапе вносим исследуемый образец в пробирки, содержащие следующие комбинации праймеров/пробы

А) MLL-F1/MLL-T1/ENL-R1;

Б) MLL-F1/MLL-T1/ENL-R2.

Таблица 5 – Последовательности олигонуклеотидов для оценки минимальной остаточной болезни у пациентов с перестройками генов *MLL-AF9*, *MLL-ENL* [4].

Ген	Название	Последовательность	Метки
MLL	MLL-F1	cgctcagccacctactacag	
	MLL-F2	aggagaatgcaggcactttga	
AF9	AF9-R1	tcacgatcgctgcagaatgt	
	AF9-R2	tggcaggactgggttgttc	
	AF9-R3	gctgctgctgctggatgaat	
ENL	ENL-R1	ggagttggacgggcttgac	
	ENL-R2	tgggcttcttgcgcagtt	
MLL	MLL-T1	cgccaagaaaagaagtcccaaaaccact	FAM/BHQ
	MLL-T2	catcctcagcactctctccaatggcaat	FAM/BHQ

4) ПЦР продукт определяется в пробирке с MLL-F2/MLL-T2/ ENL-R1/ENL-R2. На следующем этапе вносим исследуемый образец в пробирки, содержащие следующие комбинации праймеров/пробы

А) MLL-F2/MLL-T2/ENL-R1;

Б) MLL-F2/MLL-T2/ENL-R2.

После амплификации используют комбинацию праймеров и пробы, которая дает наименьшее значение *Ct* (с использованием которой амплификация выявляется на более ранних циклах ПЦР). В дальнейшем эту комбинацию используют для оценки уровня МОБ.

3.2.1. Оценка уровня экспрессии и определение минимальной остаточной болезни при анализе с использованием полуколичественного определения экспрессии генов

После подбора оптимальной комбинации праймеров/пробы идет определение уровня МОБ в ходе терапии. Для постановки ПЦР готовят реакционные смеси, содержащие необходимые реактивы для амплификации 2+2n пробирок в случае контрольного гена и 2+2n пробирки для амплификации искомого гена, где n – количество образцов, анализируемых с использованием выбранной комбинации праймеров. В качестве контрольного гена используют *ABL* (чаще) или *GUS* (таблица 4). Выбранный контрольный ген целесообразно использовать постоянно для данного типа химерных генов, предпочтительнее – для всех анализов, проводимых в лаборатории.

Для оценки уровня экспрессии от усредненного значения C_t ИГ следует вычесть значение C_t КГ на момент постановки диагноза (ΔC_t). Затем 2 следует возвести в степень ΔC_t . Полученное значение нормализованной экспрессии ИГ на момент постановки диагноза принимают за 100% и в дальнейшем с ним сопоставляют все последующие точки, выражая уровень МОБ в процентах (%) от диагноза. Изменение уровня МОБ можно также выражать в логарифмах, когда 1 логарифму соответствует изменение в 10 раз.

Если качество кДНК низкое (например, $C_t > 26-29$ циклов при амплификации гена Абельсон), и химерный ген не амплифицируется, ответ с использованием данного материала выдан быть не может – низкое качество или недостаточное количество материала. Рекомендуется также перевыделить РНК/пересинтезировать кДНК и повторить ПЦР.

Если качество кДНК низкое (например, $C_t > 26-29$ циклов при амплификации гена Абельсон), и химерный ген амплифицируется, можно говорить о том, что экспрессия гена в образце присутствует, но количественно интерпретировать данные не представляется возможным с использованием данного материала. Рекомендуется также заново выделить РНК и/или повторно синтезировать кДНК и повторить ПЦР.

В случае высокого качества материала, при отсутствии амплификации ИГ речь идет о том, что экспрессия изучаемого гена в исследованном образце не определяется или отсутствует.

3.3. Определение минимальной остаточной болезни у пациентов с экспрессией *MLL-AF6*, *MLL-AF10*, *MLL-ELL*

В случае, если отсутствуют стандартные праймеры/проба для оценки уровня МОБ, продукты амплификации, полученные в ходе диагностики, секвенируют с использованием праймеров, указанных в таблице 3. Для этого 3 мкл очищенного продукта смешивается с прямым или обратным праймером и вносятся реактивы в соответствии с методикой, описанной в наборе, содержащем флуоресцентно меченые дидезоксинуклеотиды. После проведения реакции секвенирования в продукт секвенирования объемом 20 мкл вносится 5 мкл 0,125 М ЭДТА, 65 мкл 96% спирта, инкубируется в течение 15 минут и осаждается при 14000 оборотов в минуту. После удаления супернатанта в пробирку вносится 120 мкл 70% спирта и центрифугирование повторяют в течение 20 минут. Затем супернатант удаляют, осадок сушат, ресуспендируют в 15-20 мкл формамида, денатурируют в течение 5 минут при 95⁰С и загружают в генетический анализатор для проведения капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

Полученные данные анализируют с использованием баз данных, определяют точку слияния экзонов генов партнеров и проводят дизайн праймеров/проб исходя из следующих параметров:

Размер ПЦР продукта – 50-150 пар оснований

Размер праймеров (олигонуклеотидов) – 18-23 основания

Температура отжига праймеров – 58-62⁰С

Содержание GC – от 30 до 80%

Максимальное количество одинаковых последовательных оснований -5

Размер пробы (олигонуклеотида) – 18-30 оснований

Температура отжига праймеров – 68-72⁰С

Содержание GC – от 30 до 80%

Проба размещается между праймерами и метится с 5' конца красителем, с 3' конца – гасителем.

После подбора праймеров/пробы, проводят проверку на наличие полиморфизмов в местах посадки праймеров, для снижения вероятности формирования димеров праймеров, гомодимеров, шпилечных структур. После подбора и заказа праймеров/пробы, анализ проводят подобно описанному в разделе 3.2.1.