

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

«*12*» _____ 2020 г.

Регистрационный № *036-0520*



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЛЕЦ ДНК Т - И В -
КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В
РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»; государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»».

АВТОРЫ: Полякова Е.А., Стёганцева М.В., Алешкевич С.Н.,
Жаранкова Ю.С., к.м.н. Минаковская Н.В., к.м.н. Остроушко Д.В.,
Берестень С.А., к.б.н., доцент Белевцев М.В.

Минск, 2020

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод определения эксцизионных колец Т- и В-клеточного рецептора методом мультиплексной ПЦР в реальном времени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг направленных на диагностику отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм.

Метод, изложенный в настоящей инструкции предназначен для врачей-гематологов, врачей лабораторной диагностики и иных специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с отдельными нарушениями, вовлекающими иммунные механизмы в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D80 – D89).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ПК – периферическая кровь;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- РВ - ПЦР – полимеразная цепная реакция в «режиме реального времени»;
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер;
- ДНТФ – дезоксинуклеотидфосфат;
- Трис – химическое соединение трис (гидроксиметил) аминметан $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$;
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
- ALB – альбумин;
- DB – лизирующий буфер (от англ. digestion buffer);
- TREC – эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора (от англ. T-cell receptor excision circles);
- KREC – эксцизионное кольцо рекомбинации каппа цепи (от англ. kappa-deleting recombination excision circles);
- RCLB – буфер, лизирующий эритроциты (от англ. red cell lysis buffer);
- ТЭ-буфер – буферный раствор (состоит из Трис и ЭДТА);
- Kb – килобаза – 1000 пар нуклеотидов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Ламинарный бокс с бактерицидной лампой;
микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14000 об/мин;
морозильная камера;
микроволновая печь;
аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле и источник тока;
ультрафиолетовый трансиллюминатор (длина волны 312 нм);
документирующая система для визуализации результатов электрофореза;
спектрофотометр;
термомиксер;
вортекс;
компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме «реального времени», хранения данных и анализа;
прибор для электропорации;
кюветы для электропорации;
шпатели;
чашки Петри;
скальпели;
весы для взвешивания навесок;
дозаторы переменного объема (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл);
одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200, 1000 мкл;
одноразовые эппендорфы от 0,2 мкл-1,5 мл;
одноразовые пробирки объемом 15 мл;
одноразовая пластиковая посуда для постановки ПЦР в режиме «реального времени», микропробирки, стрипы, 96-луночные плашки (посуда должна подходить к прибору, на котором выполняют постановку РВ-ПЦР).

Реактивы

Термостабильная ДНК полимеразы;

агароза;
бромистый этидиум;
ДНК-маркеры (размерная лестница);
вода деионизованная;
изопропанол;
ацетат аммония 8М;
фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1);
формаид;
лизирующий буфер (DB);
флуоресцентно-меченные праймеры для амплификации генов альбумина
TREC, KREC;
2-ух кратный мастер микс для проведения ПЦР в «реальном времени» с
флуоресцентной пробой;
фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1);
фосфатно-солевого буфер (рН 7,2-7,4);
этанол, 70%;
этанол, 96%;
акриламид/бис-акриламил(39:1);
персульфат аммония;
temed;
трис-борат-ЭДТА(ТВЕ) буфер;
буфер ТЭ;
среда для культивирования клеток.

1 Подготовка материала для исследования.

1.1 Выделение ДНК из мононуклеаров периферической крови, «сухих пятен» крови, мазков крови на гематологических стеклах

В качестве материала для исследования используют свежие образцы периферической крови, «сухие пятна крови» на фильтровальной бумаге, а также мазки крови на гематологических стеклах. Для забора крови используют пробирки с консервантом (ЭДТА, цитрат натрия). После забора материал в пробирке перемешивают путем покачивания. До исследования материал хранят при комнатной температуре не более 24 часов. В случае использования «сухих пятен крови» - образец капли крови наносят на фильтровальную бумагу типа TFN и высушивают при комнатной температуре в течение 6 часов, годность «сухих пятен крови» на фильтровальной бумаге составляет год/в соответствии с инструкцией производителя.

А) Образец цельной крови. Образцы периферической крови переносят в эппендорф и смешивают с RCLB в соотношении 1:3, инкубируют 10 мин и центрифугируют в течение 5 мин при 3000 оборотах/мин. В случае наличия осадка эритроцитов этап отмывки лизирующим буфером повторяют, затем отмывают лейкоциты в ФСБ. Отмытые в ФСБ 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 (100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) для разрушения клеточной стенки лейкоцитов добавляют в объеме 100 мкл на 1 млн клеток, обычно 600-800 мкл. Сразу после добавления лизат перемешивают пипетированием или вортексированием. Лизис проводят при 50-55 °С при перемешивании в течение 1 - 2 ч. Центрифугируют 1 минуту при 5000 оборотах/мин. Большим наконечником отбирают верхнюю, водную фазу, которую переносят в новую пробирку. Далее высаливают ДНК, для этого к лизату добавляют 8М ацетат аммония в объеме, равном объему лизата. Смесь тщательно перемешивают на вортексе и охлаждают. Центрифугируют при

максимальных оборотах 10 - 20 минут с охлаждением. Отбирают водную фазу, которая содержит ДНК и переносят в новую пробирку. Далее проводят преципитацию и отмывку ДНК. Преципитацию (осаждение) ДНК осуществляют равным объемом изопропанола. Смесь центрифугируют на 14000 оборотов 20 минут с охлаждением. Отбирают супернатант типсом или вакуумным аспиратором.

Б) Сухие пятна крови. В пробирку объемом 1,5 - 2,0 мл из сухого пятна крови на фильтровальной бумаге выбивают 3 диска при помощи ручного дырокола. После каждого образца ножку пробойника дырокола протирают 70% спиртом для исключения контаминации. Добавляют ДВ-буфер и инкубируют в термошейкере при 50 - 55 °С в течение 1 - 2 часов или при 37 °С 12 часов. Далее выделение ДНК проводят также, как и из цельной крови.

В) Мазки на гематологических стеклах. На поверхность предметного стекла с мазком крови наносят 200 - 500 мкл лизирующего ДВ-буфера, оставляют на 5 минут и затем смывают фиксированный материал в эппендорф объемом на 1,5 мл. Далее выделение ДНК проводят также, как и из цельной крови.

1.2 Растворение и измерение концентрации ДНК

Стандартное растворение осуществляют в 30 - 200 мкл ТЭ - буфера (рН = 7,4 - 8,0). ДНК растворяют в термомиксере при 25 - 40 °С в течение 1 ч. После инкубации раствор ДНК тщательно перемешивают на вортексе, осаждают капли центрифугированием 5-10 секунд. Измерение выполняют на спектрофотометре, 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. Раствор ДНК должен иметь концентрацию 100 - 150 нг/мкл; минимальная пороговая концентрация 10 - 15 нг/мкл. В случае соответствия нормам данный материал принимают к исследованию.

2 Создание калибраторов для количественного анализа методом ПЦР с детекцией результатов в «реальном времени» на основе плазмидного вектора pCR2.1-ТОРО

Калибраторы (далее - стандарты) представляют собой рекомбинантную плазмиду pCR2.1-ТОРО несущую последовательность - ALB - TREC – KREC. Точную концентрацию плазмиды измеряют с помощью полимеразной цепной реакции в «реальном времени» с соответствующими олигонуклеотидными праймерами и флуоресцентными пробами.

Для создания плазмидного стандарта используют вектор pCR2.1-ТОРО Vector. Далее в вектор, клонируют амплифицированные фрагменты контрольного гена альбумина, TREC и KREC. Процесс клонирования включает несколько последовательных этапов.

2.1 Амплификация: альбумина, TREC, KREC

Для амплификации альбумина проводят полимеразную цепную реакцию с использованием геномной ДНК и специфичных к альбумину праймеров, содержащих на 5' конце последовательности сайтов рестрикции NotI и XhoI с соответствующим количеством фланкирующих нуклеотидов.

Таблица 1 – Праймеры для ПЦР амплификации гена альбумин с сайтами рестрикции NotI и XhoI

Название	Последовательность 5'-3'	Размер
ALB_NotI_Forvard	GCGGCGGCCGCCCCGTGGTCCTGAACCAGTTA	31
ALB_XhoI_Reverse	CGCCTCGAGACATTCACCTTCCATGCAGA	29

Для амплификации TREC проводят полимеразную цепную реакцию с использованием геномной ДНК и специфичных для TREC праймеров.

Таблица 2 – Праймеры для ПЦР амплификации кольцевой молекулы ДНК TREC (NC_000014.9) с сайтами рестрикции HindIII

Название	Последовательность 5'-3'	Размер
TREC_Forvard	CCATGCTGACACCTCTGGTT	21
TREC_Reverse	CTTCATTCACCGTTCTCACGA	21

Для амплификации KREC проводят полимеразную цепную реакцию с использованием геномной ДНК и специфичных для KREC праймеров, содержащих на 5' конце последовательности сайтов рестрикции HindIII с соответствующим количеством фланкирующих нуклеотидов.

Таблица 3 – Праймеры для ПЦР амплификации кольцевой молекулы ДНК KREC (NC_018913.2) с сайтами рестрикции HindIII.

Название	Последовательность 5'-3'	Размер
KREC_HindIII Forward	CCCAAGCTTTCAGCGCCCATACGTTTCT	29
KREC_HindIII Reverse	CCCAAGCTTGTGAGGGACACGCAGCC	26

ПЦР-смесь содержит прямой и обратный праймеры, приведенные выше. ПЦР-реакцию проводят в объеме 25 мкл и включающем: 5 мкл 5-и кратного буфера, 0,2 мкл 25 мМ ДНТФ, 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,15 мкл 5Ед термостабильной полимеразы, по 0,125 мкл праймеров F/R 100 пмоль, 15,9 мкл воды. Для амплификации используют следующие температурные условия:

- I. Предварительная денатурация 95°C - 10 мин
- II. 35 циклов: денатурация 95°C - 15 сек, отжиг 60°C - 20 сек, синтез 72°C - 30 сек
- III. Заключительная элонгация 72°C - 5 мин.
- IV. Охлаждение 4 °C.

Эффективность ПЦР оценивают методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Для этого 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. Визуализацию результата электрофореза проводят с использованием системы гель документирования и программного обеспечения.

По результатам электрофореза проводят очистку полученного ПЦР - продукта любым набором реагентов для очистки ПЦР продукта.

2.2 Измерение концентрации ПЦР - продукта

Концентрацию продуктов амплификации альбумина, TREC и KREC измеряют методом электрофореза в 2% агарозном геле с использованием маркера для ПЦР размером 100 bp +1 Kb.

Проводят электрофорез в агарозном геле, как описано ранее.

Далее проводят последовательное клонирование полученных продуктов амплификации гена альбумина, TREC, KREC.

2.3 Лигирование ПЦР - продукта TREC с плазмидным вектором

Очищенный ПЦР - продукт амплификации TREC лигируют в плазмидный вектор pCR2.1-TOPO Vector. Встраивание происходит по акцепторным TA - концам вектора.

Лигирование проводят с использованием набора реагентов для лигазной реакции, согласно прилагаемой инструкции. Соотношение концентраций вставка/вектор определяют с помощью программы «Ligation Calculator» (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html). Лигазную смесь инкубируют 12 часов при +4°C.

2.4 Трансформация компетентных клеток E. coli плазмидой pCR2.1-TOPO

В качестве компетентных клеток используют штамм DH5-α бактерии E. coli. Получение компетентных клеток проводят кальций-холодовым методом по T. Maniatis. В 5 мл среды для культивирования, содержащей триптон, дрожжевой экстракт, и гидрофостфат калия вносят отдельную колонию клеток E. coli. Флакон помещают на шейкер и инкубируют при +37°C в течение 3 часов. В стерильные эппендорфы вносят полученную культуру клеток по 1,5 мл, охлаждают до +4°C и центрифугируют 10 мин при +4°C при 3000 об/мин, осадок ресуспендируют в 500 мкл 0,1М CaCl₂. Образцы помещают в холодильник на +4°C на 40 минут. Далее центрифугируют 10 минут при +4°C при 3000 об/мин. Полученный осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,1М CaCl₂.

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 среду для культивирования до конечного объема 1 мл и помещают в термостат на 1 час. 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, применяемую при клонировании генов для определения экспрессии в клетке гена фермента β -галактозидазы. После трансформации клетки культивируют 18 ч в термостате при +37°C. При инкубации популяции компетентных клеток DH5- α в присутствии антибиотика ампициллина реплицируются только те клоны, которые содержат плазмиду. Если вставка выполнена успешно на чашке будут колонии белого цвета (из-за потерянной комплиментации β - галактозидазы).

Трансформацию плазмиды возможно проводить так же методом электропорации. Подготовку компетентных клеток *E. coli* для электропарации проводят аналогично, как и для кальций-холодового метода. Для этого бактериальные клетки культивируют 12 – 18 часов в среде, содержащей триптон, дрожжевой экстракт, и гидрофостфат калия при +37°C. Затем клетки отмывают дистиллированной водой 2-3 раза, смешивают с раствором плазмидной ДНК и подвергают смесь воздействию электрического импульса с напряженностью 18 - 21 тыс. В/см. Обработанные клетки высевают на чашки Петри и растят 18ч при +37°C. Затем отбирают позитивные трансформанты.

2.5 Проверка трансформированных клеток *E. coli* на содержание плазмидной ДНК

С каждой чашки Петри выбирают по 5 колоний и проверяют их специфичность при помощи РВ-ПЦР. Для этого в каждую из 5 пробирок, предназначенных для РВ - ПЦР вносят 12,5 мкл 2-ух кратного мастер микса, 5,9 мкл воды, по 0,6 мкл специфичных для TREC прямого и обратного праймеров, 0,4 мкл флуоресцентной метки. Общий объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Затем в каждую лунку последовательно вносят типсом каждую из пяти отобранных колоний и ресуспендируют. Пробирки осаждают

при 12000 оборотах в течение 1 минуты. Запускают РВ-ПЦР с протоколом амплификации:

95°C – 10 мин

95°C – 15 сек

60°C – 1 мин



50 циклов

После завершения ПЦР оценивают результат. Выбирают образцы с S – образной положительной амплификацией.

2.6 Секвенирование плазмиды и проверка их аутентичности

В результате удачного клонирования встроенный фрагмент соответствует референсной ДНК. Далее плазмиду из клеток выделяют с использованием набором реагентов, предназначенных для выделения плазмидной ДНК.

Плазмиду, выделенную из трансформированной культуры *E. coli*, секвенируют и определяют ее аутентичность.

Для анализа используют программы Sequencing Analysis 5.2 и Bioedit. Референсные последовательности находятся в онлайн базе Ensembl.org.

2.7 Рестрикция ПЦР - продукта KREC и плазмиды ферментом HindIII

Очищенный ПЦР - продукт KREC и полученную плазмиду pCR2.1-ТОРО, содержащую последовательность TREC режут эндонуклеазой рестрикции HindIII, для этого смешивают в пробирке по 1 мкл (1Ед) рестриктазы HindIII, 2 мкл 10-и кратного буфера для рестрикции, 2 мкл деионизированной воды и 5 мкл матрицы (ПЦР - продукта; плазмиды), общий объем смеси составляет 10 мкл. Реакция протекает при +37°C в течение 120 минут. Затем 10 мкл продукта рестрикции вносят в лунки 1,5% агарозного геля, содержащего этидиум бромид. Проводят электрофорез, как описано ранее.

Далее измеряют концентрацию продуктов рестрикции KREC и плазмиды, вырезают и чистят из агарозного геля набором реагентов,

предназначенных для очистки продуктов рестрикции из геля. Проводят лигирование, трансформацию, проверку трансформированных клеток *E. coli* на содержание плазмидной ДНК с вставкой KREC, выделение плазмиды из культивированной среды и секвенирование, как описано ранее.

2.8 Двойная рестрикция альбумина и плазмиды ферментами NotI и XhoI

Очищенный ПЦР - продукт альбумина и плазмиду pCR2.1-TOPO, содержащую последовательность TREC и KREC режут эндонуклеазами рестрикции NotI и XhoI, для этого смешивают в пробирке по 1 мкл (1Ед) каждой рестриктазы, 2 мкл 10-и кратного буфера для рестрикции, 1 мкл деионизированной воды и 5 мкл матрицы (ПЦР- продукта; плазмиды), общий объем смеси составляет 10 мкл. Реакция протекает при +37°C в течение 120 минут. Затем продукты рестрикции вносят в лунки 1.5% агарозного геля, содержащего этидиум бромид. Проводят электрофорез, как описано ранее. Далее измеряют концентрацию продукта рестрикции ALB и плазмиды, вырезают из агарозного геля и проводят очистку, лигирование, трансформацию, проверку трансформированных клеток *E. coli* на содержание плазмидной ДНК с вставкой ALB, выделение плазмиды из культивированной среды и секвенирование, как описано ранее.

В результате удачного клонирования получают плазмиду, содержащую три вставки: ALB, TREC и KREC как представлено на рисунке 1.

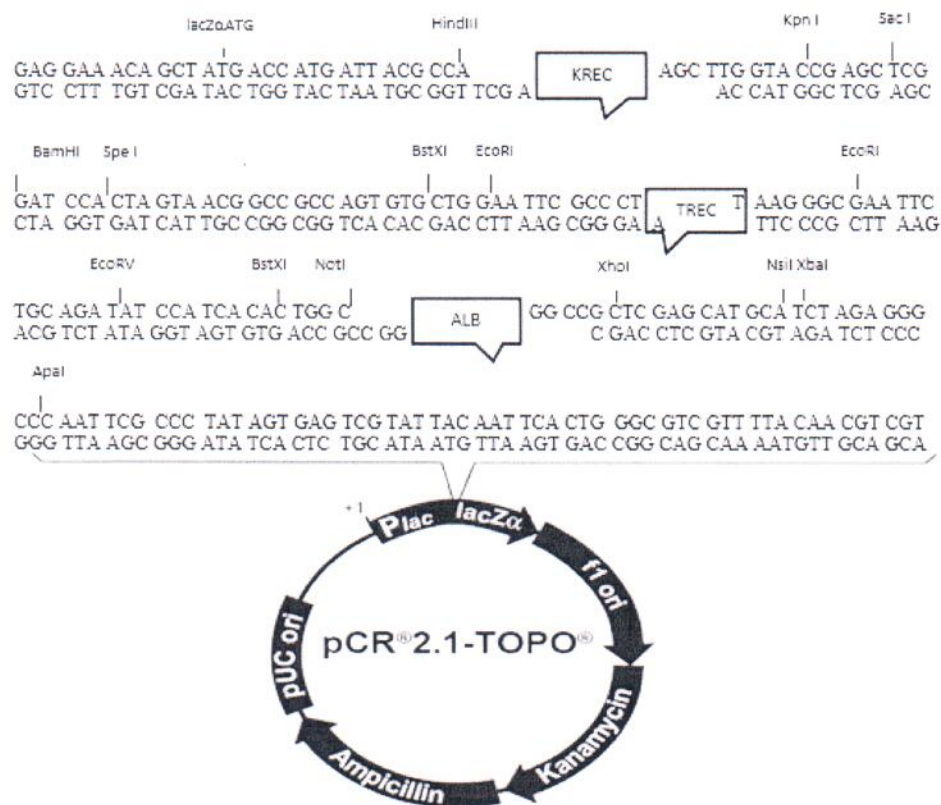


Рисунок 1 – Плазмидная карта с вставками ALB, TREC, KREC

2.9 Измерение концентрации, полученной плазмиды pCR2.1-TOPO, содержащей последовательности ALB - TREC - KREC

Выделенную плазмиду переводят в линейную форму посредством рестрикции ферментом Xba I. Реакция протекает при +37°C в течение 120 минут в объеме 10 мкл. Для рестрикции в одном эппендорфе смешивают: рестриктазу Xba I - 1 мкл, 2 мкл 10-и кратного буфера для рестрикции, 5 мкл матрицы, 2 мкл воды.

2.10 Определение концентрации плазмиды и определение количества копий

Измеряют концентрацию полученной плазмиды, переведенной в линейную форму посредством рестрикции ферментом Xba I на флуориметре. По полученной концентрации (нг/мкл) и размеру молекулы (пары оснований) определяют количество копий в мкл раствора при помощи «Calculator for

determining the number of copies of a template» (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

2.11 Разведения плазмидной ДНК

Для построения калибровочной кривой используют разведения с шагом в 10 раз плазмидной ДНК, переведенной в линейную форму, содержащей соответствующие вставки ALB, TREC, KREC, концентрация которых составляет 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл как представлено на рисунке 2.

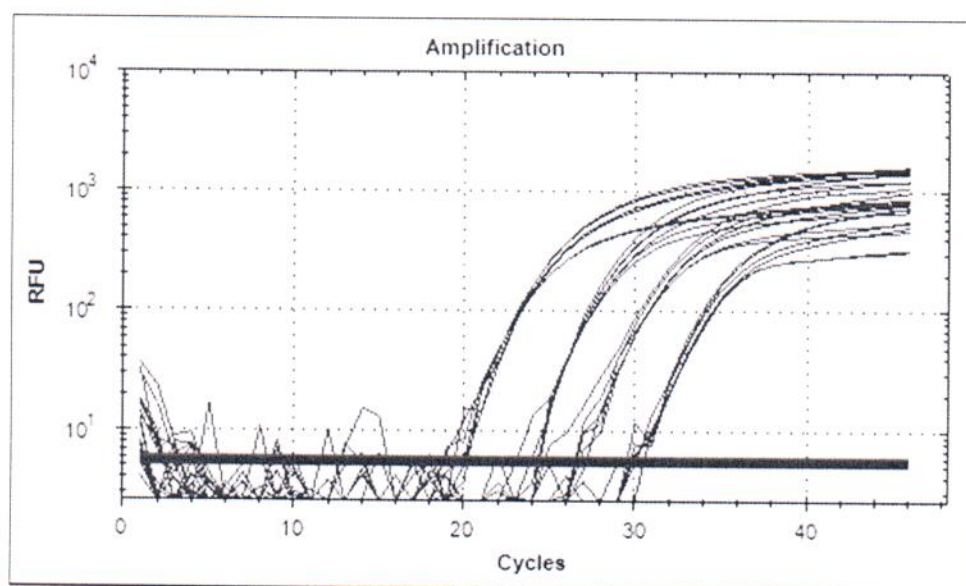


Рисунок 2 – Кривые амплификации стандартных разведений плазмидной ДНК — ALB — TREC — KREC. (Логарифмическая шкала)

Все параметры стандартных кривых амплификации используемых разведений находятся в пределах нормы и представлены в таблице 4.

Таблица 4. – Параметры стандартных кривых амплификации плазмидной ДНК альбумина, TREC, KREC.

Мишень	Наклон	Интерсепт	Коэффициент корреляции R^2	Эффективность%
ALB	-3,328	40,1	0.998	98,1
TREC	-3,282	39,8	0.999	99,4
KREC	-3,335	39,9	0.995	99,7

Количество альбумина, TREC, KREC определяют с помощью ПЦР в «реальном времени». Данные анализируют с использованием программного обеспечения для амплификатора.

3 Определение количества копий TREC и KREC методом мультиплексной ПЦР в «реальном времени»

Мультиплексную ПЦР выполняют с исследуемым образцом ДНК и праймерами. Полная панель праймеров включает три пары олигонуклеотидов, меченных 3-мя разными флуоресцентными метками: олигонуклеотиды для контрольного гена альбумина с флуоресцентной меткой FAM, для TREC с меткой HEX, для KREC с Cy5. Последовательности праймеров приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Праймеры с флуоресцентными зондами для РВ-ПЦР

Мишень	Праймер / Проба	Последовательность 5'-3'
ALB	Прямой	TGAACAGGCGACCATGCTT
	Обратный	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
	Проба	FAM-TGCTGAAACATTCACCTCCATGCAGA-BHQ1
sjTREC	Прямой	CCATGCTGACACCTCTGGTT
	Обратный	CTTCATTCACCGTTCTCACGA
	Проба	HEX-CACGGTGATGCATAGGCACCTGC-BHQ1
sjKREC	Прямой	TCAGCGCCCATTACGTTTCT
	Обратный	GTGAGGGACACGCAGCC
	Проба	Cy5 -CCAGCTCTTACCCTAGAGTTTCTGCACGG-BHQ2

Для проведения ПЦР готовят раствор, который включает смесь оригинальных праймеров и зондов с исходной концентрацией 100 пмоль/мкл, смешанных в одной пробирке. Технология приготовления смеси праймеров описана в таблице 6.

Концентраты и раствор смеси олигонуклеотидов хранят при -20°C, избегая многократного размораживания и замораживания растворов. Смесь праймеров размораживают при комнатной температуре непосредственно перед постановкой ПЦР. Для количественной оценки кольцевых структур

TREC/KREC и контрольного гена ALB используют серийные разведения линейризованной плазмидной ДНК, содержащей вставки альбумин, TREC, KREC соответственно с концентрацией 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл.

Таблица 6 – Приготовление раствора смеси праймеров

Мишень	Праймер/проба	Исходная концентрация (пмоль/мкл)	Конечная концентрация (пмоль/мкл)	Объем (мкл)
ALB	Прямой праймер	100	6,0	1,5
	Обратный праймер	100	6,0	1,5
	Олигонуклеотидный зонд	100	4,0	1,0
sjTREC	Прямой праймер	100	12,0	3,0
	Обратный праймер	100	12,0	3,0
	Олигонуклеотидный зонд	100	8,0	2,0
sjKREC	Прямой праймер	100	12,0	3,0
	Обратный праймер	100	12,0	3,0
	Олигонуклеотидный зонд	100	8,0	2,0
Вода				до 25 мкл

Далее готовят реакционную смесь объемом 25 мкл, в соответствии с таблицей 7 Реакционная смесь для ПЦР состоит из: 2-ух кратного мастер микса, который не должен содержать референсных красителей, т.к. они могут перекрываться с используемыми метками по флуоресценции, воды и раствора смеси праймеров (таблица 6). Все образцы вносят в лунки планшета либо стрипов в дубликатах.

Таблица 7 – Приготовление реакционной смеси

Реагенты	Объем на 1 реакцию (мкл)
2-ух кратный мастер микс	12,5
Смесь праймеров	1,25
Вода деионизированная	6,25
ДНК (в миксе не входит)	5,0

Вносят реакционную смесь и исследуемые образцы ДНК в 96-луночную плашку или стрипы: сначала вносят реакционную смесь – 20 мкл, затем ДНК

– 5 мкл, отрицательные контроли, которые представляют собой заведомо отрицательную матрицу, т.е. ДНК, которая не содержит молекул TREC и KREC (например, ДНК клеточных линий HL60 или K562) либо деионизированную воду в объеме 5 мкл, в последнюю очередь стандарты – 5 мкл. Плазмидные стандарты приготовлены для трех мишеней одновременно и включают следующие концентрации: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл. Плазмидные стандарты предварительно размораживают при комнатной температуре.

Далее плашку закрывают оптическими крышками либо пленкой. Перед постановкой в амплификатор осаждают капли со стенок плашки центрифугированием в течение минуты на 1200 об/мин. Загружают плашку в ПЦР-блок. Программируют амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала как описано в таблице 8.

Таблица 8 – Программа амплификации

Температура, °С	Время	Кол-во циклов
95	10 мин	1
95	15 сек	50
60	60 сек	
Детекция флуоресцентного сигнала		

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM/Green, HEX/Yellow и Cy5/Red для трех проб в одной лунке соответственно.

После завершения ПЦР - реакции проводят анализ полученных результатов.

4 Анализ результатов

Ct – значение номер цикла, в котором сигнал флуоресценции пересекает пороговую линию (threshold).

Threshold – пороговый уровень флуоресценции. Величину Threshold устанавливают вручную на уровне 30 % для каналов (FAM, HEX, Cy5), от

максимального уровня флуоресценции. При этом кривая флуоресценции должна находиться в пределах стадии раннего экспоненциального роста накопления флуоресценции.

Slope (наклон), или угловой коэффициент. Для десятичной логарифмической шкалы SQ составляет 3,3.

Коэффициент корреляции (R). Рассчитывается прибором автоматически как коэффициент Пирсона между разными разведениями. Значение коэффициента R должно быть не ниже 0,98, в идеале составляет 1, а эффективность реакции в пределах (95-105%).

Интерсепт (intercept) – точка пересечения стандартной прямой оси ординат, количественно выражается в значении C_t , которое условно является порогом теоретической чувствительности метода.

Анализ результатов ПЦР проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Принцип анализа результатов амплификации следующий: анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам.

Результат амплификации по каналу считают положительным, если кривая флуоресценции имеет типичную для ПЦР в режиме «реального времени» S-образную форму, пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным — в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения C_t).

В начале анализируют показатели контрольного гена альбумина. Для этого выбирают канал флуоресценции FAM. Значение стандартного отклонения (StD) для порогового цикла для каждой анализируемой пробы не должно превышать 0,5 в повторах (это правило действительно и для всех остальных мишеней). Образец считают положительным, если C_t для контрольного гена находится в диапазоне 18,0-28,0 циклов. При этом количество копий контрольного гена альбумина должно быть не менее 1000.

Если значение C_t не укладывается в диапазон 18,0-28,0 циклов, – образец считают отрицательным. Если в одной из лунок с образцом, внесенном в дубликаты есть детекция флуоресцентного сигнала, а в другой нет – образец считают отрицательным.

Далее анализируют TREC, выбирают канал флуоресценции HEX. Данные так же анализируют по пересечению кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Положительным считают образец с значением C_t ниже значения интерсепт (39-40 цикла). Затем анализируют KREC, для этого выбирают канал флуоресценции Cy5. Положительным считают образец с значением C_t ниже значения интерсепт (39-40 цикла).

Далее проводят количественную оценку результатов, для этого используют метод «стандартной кривой», которая позволяет на основании экспериментальной модели пересчитать уровень амплификации (C_t) измеряемого образца в значение стандартного количества (SQ), которое выражает количество мишени в логарифмическом виде относительно эталонного образца. После завершения ПЦР прибор автоматически строит стандартную кривую. Каждая калибровка количественно характеризуется тремя параметрами: углом наклона (slope), коэффициентом корреляции R, интерсептом.

Результаты реакции считают достоверными, если в лунках с отрицательным контролем сигнал флуоресценции отсутствует (детектируемое значение C_t) по всем трем каналам, либо проходит на уровне значения интерсепт + 1 (≥ 40 цикла).

При генерации отчета в программе запуска РВ - ПЦР автоматически рассчитываются средние значения C_t и среднего значения (SQ) для всех образцов.

В случае, когда все критерии ПЦР «в режиме реального времени» выполнены, рассчитывают количество копий TREC и KREC. Существует несколько принятых единиц измерения количества копий TREC и KREC:

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 рассчитывают исходя из того, что в каждой клетке присутствует две копии контрольного гена, а количество молекул TREC или KREC не может быть более 1. Количество копий TREC и KREC рассчитывают формуле:

$$\frac{1\,000\,000 \times \text{среднее SQ (TREC или KREC)}}{\text{среднее SQ (Альбумин)}/2} = \text{копий TREC или KREC}/10^6 \text{ клеток}$$

Рисунок 3 – Формула для расчёта количества копий TREC/KREC на 1 млн клеток

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») рассчитывают количество копий TREC и KREC на 1 мл крови по следующей формуле:

$$\frac{((\text{TREC или KREC})/106) \times (\text{Абс. Число (Lf+Mn)}/\text{мл})}{10^6} = \text{копий TREC или KREC}/\text{мл крови}$$

Рисунок 4 – Формула расчёта количества копий TREC/KREC на 1 мл крови

*- вместо абсолютного числа лимфоцитов и моноцитов используют абсолютное число лейкоцитов, в зависимости от исходного материала, Lf – лимфоциты, Mn – моноциты.

Например, среднее количество копий TREC по результатам РВ-ПЦР получилось 100, а количество копий альбумина – 15000. Количество Lf+Mn = $(12,5+2,1)*10^9/л$ или $(12,5+2,1)*10^6/мл$.

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

$$\frac{13\ 333 \times (12,5+2,1)*10^6}{10^6} = 194\ 661 \text{ копии/мл крови}$$

Рисунок 5 – Образец расчёта количества копий TREC/KREC 1 мл крови

В результате проведенных расчётов, получаем количество копий TREC и KREC на 1 млн клеток крови либо на 1 мл крови, если имеются данные об абсолютном количестве лейкоцитов.

5 Принятие решений о наличии /отсутствии отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм

Далее полученные значения сравнивают с диапазоном нормальных значений для здоровых индивидов соответствующей возрастной категории (таблица 9). Расчет диапазона нормальных значений был выполнен с применением непараметрического метода Манна-Уитни. Данный диапазон охватывает 95% всех значений полученных результатов. Данные по количеству копий TREC и KREC были рассчитаны по 2,5% и 97,5% уровням согласно ГОСТ Р 53022.3-2008.

Таблица 9 – Диапазон нормальных значений молекул TREC и KREC

	TREC		KREC	
	Доношенные новорожденные	Дети до 18 лет	Доношенные новорожденные	Дети до 18 лет
На 10^6 клеток	$3,38*10^3 - 2,38*10^5$	$5.5*10^3 - 9.2*10^4$	$2,73*10^3 - 2,37*10^5$	$2.8*10^3 - 3*10^4$
На 1 мл крови	$4,5*10^4 - 3,7*10^6$	$3,8*10^4 - 5*10^5$	$3,5*10^4 - 2,6*10^5$	$1,75*10^4 - 2*10^5$

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 отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм. Для уточнения проводят дополнительные исследования, в частности определение субпопуляционного состава лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Осложнения	Причины/ Следствие	Пути устранения
Разница показателей Ct образцов в дубле превышает 0,5	Результат реакции для анализируемого образца признают недействительным. Причиной может служить плохое пипетирование	Реакцию ПЦР для этого образца необходимо переставить
Количество копий контрольного гена ALB < 1000 копий	Недостаточное количество ДНК (<10 нг/мкл)	При хорошем качестве ДНК повторить реакцию, при низком – перевыделить ДНК и повторить ПЦР реакцию
Ни в одной лунке не наблюдают амплификации при наличии амплификации от калибраторов	- Недостаточное количество ДНК - Неправильное выделение ДНК из исследуемого материала, и как следствие загрязнение ДНК ингибиторами ПЦР - Дефект реагентов и оборудования	Измерить количество, оценить качество ДНК, если материал соответствует всем параметрам - повторить эксперимент. Если материал не соответствует требованиям – перевыделить ДНК.
Одна из лунок в дубле имеет положительное значение, а другая отрицательное –	Образец считают не валидным и не может быть проанализирован.	Реакцию ПЦР для этого образца необходимо переставить
Отсутствие S-образной кривой	Нестабильная амплификация, что может быть связано с особенностями флуоресцентной метки, наличием соответствующего метке гасителя, качеством амплификации мишени.	Повысить температуру отжига праймеров Изменить дизайн праймеров Добавить диметилсульфоксид (ДМСО) и/или бетаин.
Наличие флуоресцентного сигнала	Контаминация	Необходимо переставить реакцию ПЦР в реальном

(детектируемое значение Ct) в пробах отрицательных контролей		времени. При этом желательно взять ранее не использованные реагенты.
Низкая эффективность амплификации по искомым мишеням включая калибраторы	Разрушение флуоресцентного зонда	Повторить реакцию, если проблема осталась – приготовить новый сток праймеров из аликвот используемых олигонуклеотидов / перезаказать праймеры

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 отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм. Дополнительно осуществляют определение субпопуляционного состава лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Осложнения	Причины/ Следствие	Пути устранения
Разница показателей Ct образцов в дубле превышает 0,5	Результат реакции для анализируемого образца признают недействительным. Причиной может служить плохое пипетирование	Реакцию ПЦР для этого образца необходимо переставить
Количество копий контрольного гена ALB < 1000 копий	Недостаточное количество ДНК (<10 нг/мкл)	При хорошем качестве ДНК повторить реакцию, при низком – перевыделить ДНК и повторить ПЦР реакцию
Ни в одной лунке не наблюдают амплификации при наличии амплификации от калибраторов	- Недостаточное количество ДНК - Неправильное выделение ДНК из исследуемого материала, и как следствие загрязнение ДНК ингибиторами ПЦР - Дефект реагентов и оборудования	Измерить количество, оценить качество ДНК, если материал соответствует всем параметрам - повторить эксперимент. Если материал не соответствует требованиям – перевыделить ДНК.
Одна из лунок в дубле имеет положительное значение, а другая отрицательное –	Образец считают не валидным и не может быть проанализирован.	Реакцию ПЦР для этого образца необходимо переставить
Отсутствие S-образной кривой	Нестабильная амплификация, что может быть связано с особенностями флуоресцентной метки, наличием соответствующего метке гасителя, качеством амплификации мишени.	Повысить температуру отжига праймеров Изменить дизайн праймеров Добавить диметилсульфоксид (ДМСО) и/или бетаин.
Наличие флуоресцентного сигнала (детектируемое)	Контаминация	Необходимо переставить реакцию ПЦР в реальном

значение Ct) в пробах отрицательных контролей		времени. При этом желательно взять ранее не использованные реагенты.
Низкая эффективность амплификации по искомым мишеням включая калибраторы	Разрушение флуоресцентного зонда	Повторить реакцию, если проблема осталась – приготовить новый сток праймеров из аликвот используемых олигонуклеотидов / перезаказать праймеры