

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

РЕСПУБЛІКАНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВО-МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ

УЗГОДЖЕНО

Начальник Головного управління
медичної допомоги дорослому
населенню МОЗ України



Т.В. Лобода

“ 27 ” березня 1997 р.

**МОНІТОРИНГ ХРОНІЧНОГО МІЄЛОЛЕЙКОЗУ
ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ**

(методичні рекомендації)

КИЇВ -1997

УДК 616-006:577.2.575

Установа-розробник : Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

Установа-співвиконавець: Інститут гематології та переливання крові МОЗ України

Автори:

Телегєєв Г.Д.	266-07-29
Дибков М.В.	266-07-29
Божко М.В.	266-07-29
Демиденко Д.В.	266-07-29
Малюта С.С.	266-07-29
Третяк Н.М.	440-12-20
Бондар М.В.	440-12-20

Рецензенти : д.м.н. Тімченко А.С.
к.б.н. Черепенко О.Й.

Голова експертної комісії: д.м.н. Гайдукова С.М.

**Телегєєв Г.Д., Дибков М.В., Божко М.В., Демиденко Д.В.,
Малюта С.С., Третяк Н.М., Бондар М.В.**

Моніторинг хронічного мієлолейкозу за допомогою
молекулярно-біологічних методів.

Вступ.

Хронічний мієлолейкоз (ХМЛ) в даний час є одним з небагатьох захворювань системи крові, при якому чітко встановлено маркер пухлинних клітин. Цим маркером є філадельфійська хромосома (Ph'-хромосома). Структурні зміни 22 хромосоми було описано у 1960р. Nowell та Hungerford [4]. У 1976 році було надруковано повідомлення, в якому були наведені дані про те, що Ph'-хромосома є наслідком реципрокної транслокації 22 та 9 хромосоми. Це відкриття мало великі наукові і практичні наслідки. З цього часу виявлення у клітинах кісткового мозку та периферійної крові Ph'-хромосоми є незаперечною ознакою на користь хронічного мієлолейкозу. Цей маркер клітин визначається у хворих на ХМЛ протягом всього захворювання, як у період загострення, так і в період гематологічної компенсації. Говорити про вилікування ХМЛ можна тільки в тому разі, коли буде досягнуто повної ерадикації клітин із дефектною хромосомою із кісткового мозку хворого.

Численними цитогенетичними дослідженнями виявлено дві групи даної хвороби. Ph'-позитивну, яка складає 90-97% всіх випадків і у відповідності до цього 3-10% Ph'-негативні форми ХМЛ. Клінічними спостереженнями доведено, що Ph'-негативні форми ХМЛ погано піддаються цитостатичній терапії. При цій формі ХМЛ раніше настає трансформація хронічної фази у гостру (бластна криза). Ph'-негативна форма є поганою прогностичною ознакою.

Використання традиційних цитогенетичних методів не завжди дає можливість виявляти елементи патологічного клону серед клітин крові під час лікування. Це обумовлено як значним зменшенням кількості клітин, так і чисто технічними причинами.

В даній роботі авторами представлено апробовані в клінічних умовах методи визначення філадельфійської хромосоми у хворих на

хронічну мієлоїдну лейкемію, що базуються на використанні геномних зондів та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

2. ОБЛАДНАННЯ, РЕАГЕНТИ, РЕАКТИВИ.

2.1. Обладнання.

2.1.1. Обладнання необхідне для проведення досліджень з використанням геномних зондів.

При використанні радіоактивномічених зондів лабораторія повинна мати приміщення і обладнання для ізотопного блоку класу III.

Настільна центрифуга типу Епандорф з прискоренням 1000-10000g, бажано з охолодженням; центрифуга типу К-24 або аналогічна з максимальним прискоренням 10000-12000g та охолодженням; термостати з температурою від 37°C до 80°C; холодильник з температурами 4°C та -20°C; вакуумний насос; вакуумна шафа з нагрівачем до 80°C; блоки живлення постійного струму (0-200 В, 200 мА); автоматичні піпетки зі змінним об'ємом на 2-20, 20-200 та 200-1000 мкл з наконечниками до них; пробірки Епандорф на 1,5 мл; ультрафіолетова система з довжиною хвилі 254 нм та захисним екраном; мембрани нейлонові; фотоапарат, плівка "Мікрат 300"; фільтрувальний папір; ватман ЗММ; вимірювач радіоактивності, захисні екрани, маска, рукавиці; рентгенівська плівка РМ-В або РМ-1; касети рентгенівські медичні з посилюючими екранами; камера для горизонтального і вертикального фореку з планшетами для гелів і гребінками; скляні гомогенізатори на 15-20 мл; прилад для зварювання поліетилену типу " Молнія".

2.1.1. Обладнання необхідне для проведення досліджень з використанням ПЛР.

Центрифуга типу К-24 або аналогічна з максимальним прискоренням 10000-12000g та охолодженням з центрифужними пробірками; термостат з температурою 37°C ; холодильник з температурами 4°C та -20°C; блоки живлення постійного струму (0-300 В, 200 мА); автоматичні піпетки зі змінним об'ємом на 2-20, 20-200 та 200-1000 мкл з наконечниками до них; пробірки Епендорф на 1,5 мл та 0,5 мл (тільки придатні для ПЛР!); ультрафіолетова система з довжиною хвилі 254 нм та захисним екраном; фотоапарат, плівка "Мікрат 300"; камери для горизонтального електрофорезу з планшетами для гелів і гребінками; скляні гомогенізатори на 50 мл; настільна центрифуга типу Епендорф; термоциклер; спектрофотометр.

2.2. Реагенти та реактиви

Для приготування розчинів необхідно використовувати дистильовану воду та реактиви з чистотою не нижче " ЧДА".

№ 1. Лізуючий сахарозний буфер (330 мМ сахарози, 1% TritonX100, 5мМ MgCl₂, 10 мМ тріс-НCl рН 7,6).

№ 2. Лізуючий розчин (10мМ тріс-НCl, 100мМ NaCl, 2мМ EDTA рН8,0).

№ 3. 10% SDS (додецил сульфат натрію).

№ 4. Розчин протеінази К (20 мг/мл). Зберігати розчин при -20°C.

№ 5. Насичений розчин NaCl.

№ 6. TE-буфер (10 мМ тріс-НCl, 1 мМ EDTA рН 7,6). Зберігають при 4°C.

№ 7. 1 М тріс-НCl. Зберігати при температурі 4°C.

№ 8. 0,5 М EDTA рН 8,0. Зберігати при 4°C.

№ 9. 1М MgCl₂. 2 Зберігати при 4°C.

№ 10. 10*ТБЕ буфер. 108 г тріса розчинити в 800 мл води, додати 55 г борної кислоти та 9,3г EDTA. Довести об'єм до 1л і зберігати при кімнатній температурі.

№ 11. 1*ТБЕ 100 мл розчину № 10 змішати з 900 мл води.

- № 12. 0,9% агарозний гель. Суміш готують перед приготуванням гелю. 0,9 г агарози розвести в 100 мл розчину № 11 і довести до кипіння на водяній бані або в короткохвильовій печі. Кип'ятити до повного плавлення агарози. Охолодити до 65°C.
- № 13. 6*буфер для нанесення на гель. По 25 мг бромфенолового синього та ксиленціанолу розчиняють у 30% гліцерині до об'єму 10 мл. Зберігають при 4°C.
- № 14. Концентрований розчин бромистого етидію (20 мг/мл). (Обережно, **канцероген!**). Зберігати при 4°C.
- № 15. Розчин для забарвлення гелів. 250 мкл розчину №14 додати до 500 мл води. Зберігати при 4°C. Можна використовувати неодноразово.
- № 16. 8М ацетат амонію. Зберігати при 4°C.
- № 17. 0,2 N HCl.
- № 18. Денатуруючий розчин (0,5 M NaOH, 1,5M NaCl).
- № 19. Нейтралізуючий розчин. 34 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ розчинити в 800 мл води та додати 32 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Об'єм розчину довести до 1 л.
- № 20. 10*SSC. 87,7 г NaCl та 55 г цитрату натрію розчинити в 800 мл води. Довести рН до 7,0 додаванням кількох крапель NaOH. Об'єм розчину довести до 1 літра.
- № 21. 3 М ацетат натрію рН 5,2.
- № 22. Водонасичений фенол. Перегнаний при 160°C фенол охолоджують до 70°C, додають 8-гідроксихинолін до кінцевої концентрації 0,1% і, розфасувавши на невеликі порції, зберігають при -20°C. Для приготування розчину фенолу до аліквоти додати рівний об'єм 0,1 М тріс-НCl (1 мл розчину № 7 змішати з 9 мл води). Зберігати кілька днів при 4°C до зміни забарвлення з жовтого на коричневе. **Токсично!**

- № 23. "Хлороформ". Змішати хлороформ з ізоаміловим спиртом у співвідношенні 49:1. Зберігати під шаром води при кімнатній температурі.
- № 24. Розчин для відмивки фільтрів (2*SSC, 0,1% SDS).
- № 25. 30% акриламід. 29 г акриламиду (**Обережно! Токсично! Проникає через шкіру!**) та 1 г N,N'-метиленбісакриламиду розчиняють у воді до об'єму 100 мл.
- № 26. 10% персульфат амонію.
- № 27. Денатуруючий буфер для нанесення на гель. В 10 мл деіонізованого 90% формаміду розчиняють по 25 мг ксиленціанолу та бромфенолового синього. Зберігають при -20°C .
- № 28. Буфер для елюції. 3,1 мл розчину № 16 та 100 мкл розчину №8 розводять водою до 50 мл.
- № 29. Розчин для гібридизації. В 50 мл води розчиняють 6,15 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, додають 2 мл H_3PO_4 (к), 7г SDS, 100мкл розчину №8, 0,2 г БСА і доводять об'єм до 100 мл.
- № 30. 96° етанол.
- № 31. 75° етанол.
- № 32. Легке мінеральне масло для ПЛР.
- № 33. Набір для проведення ПЛР.
- № 34. Стабілізатор (цитрат натрію, гепарін, гліюглицер).
- № 35. 5% декстран.
- № 36. Лізуючий розчин Д для виділення РНК (4М гуанідинізоціанат, 25мМ цитрат натрію, 0,5% саркозил, 0,1М 2-меркаптоетанол). Зберігати в темному місці до 1 місяця. **Токсично !**
- № 37. Водонасичений кислий фенол для виділення РНК. Перегнаний при 160°C фенол охолоджують до 70°C , додають 8-гідрокси-хинолін до кінцевої концентрації 0,1% і, розфасувавши на невеликі порції, зберігають при -20°C . Для приготування розчину

фенолу до аліквоти додати рівний об'єм **води**. Зберігати кілька днів при 4°C до зміни забарвлення з жовтого на коричневе. **Токсично!**

№ 38. 3,5% NaCl.

№ 39. 0,9% NaCl.

№ 40. 2М ацетат натрія рН 4.0

№ 41. Ізопропанол (з чистотою “чда” і вище).

№ 42. Зворотня транскриптаза з буфером до неї.

№ 43. Набір для мічення з розсіяною затравкою.

3. Матеріали і методи.

3.1. Діагностика ХМЛ із застосуванням геномних зондів.

3.1.1. Виділення ДНК з крові.

Дана методика дозволяє отримати очищену ДНК з нативної крові без застосування шкідливих органічних сполук (фенолу та хлороформу), що використовуються в більшості методик. Для дослідження беруть 5 мл крові у гепаринізовану пробірку чи додають до крові розчин №8 у співвідношенні 9:1 (якщо за якихось причин не можливе виділення крові одразу після відбору, допускається зберігання при 4°C протягом однієї доби). Кров охолоджують на льоду і додають рівний об'єм охолодженої дистильованої води (0-4°C). Гемолізують еритроцити на льоду 5 хвилин. Центрифугують клітини при 10000 g та 4°C 15 хв. Супернатант зливають, а до осадів додають 10 мл охолодженого на льоду сахарозного буферу (№1) і старанно гомогенізують в скляному гомогенізаторі 2-3 хв. Суспензію, що містить ядра та залишки клітин, центрифугують при 4500 g та 4°C 20 хв. До осаду додають 5 мл розчину №1 та повторюють процедури гомогенізації та центрифугування. До осаду додають 2 мл лізуючого розчину №2 та 200 мкл 10% SDS (№3). Обережно змішують (помітно підвищення в'язкості розчину) та додають 10 мкл протеїнази К (№4) до кінцевої концентрації 50 мкг/мл. Ін-

кубують суміш в термостаті 18 год при 37°C (за можливості при м'якому погойдуванні). Додають 1 мл насиченого NaCl (№5) ретельно, але обережно, змішують та центрифугують при 4500g 25 хв за кімнатної температури. Обережно відбирають супернатант, що містить ДНК (важливо не зачепити осад, що містить білки), і додають 2,5 об'єми 96° етилового спирту (№30) та намотують ДНК на скляну паличку або центрифугують при 10000g 15 хв з охолодженням (якщо можливо - при -20°C). ДНК, що намотана на паличку чи осаджена в пробірці, обережно, але швидко промивають 70° етанолом (№31) та підсушують на повітрі. Отриману ДНК розчиняють в 100-500 мкл ТЕ (№6) і зберігають при 4°C.

3.1.2. Визначення концентрації ДНК.

Концентрацію ДНК звичайно визначають спектрофотометрично і уточнюють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, однак етап спектрофотометрії не є обов'язковим. Для аналізу розчинів об'ємом 200 мкл користуються спеціальними 1 мм кюветами для спектрофотометрії. Необхідно встановити співвідношення поглинання при 260 та 280 нм (A_{260}/A_{280}). Концентрація розраховується за формулою $c=500 \cdot A_{260}$ [мкг/мл] при товщині шару $l=1$ мм. За співвідношенням A_{260}/A_{280} контролюють ступінь забруднення зразків білком. Для очищених препаратів цей показник складає 1,75-2,00. Зручно використовувати спектрофотометр з автоматичним визначенням концентрації зразків. Одержана концентрація може бути уточнена за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Як стандарт звичайно використовують ДНК фагу λ кількості 0,1; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мкг ДНК на лунку. Концентрацію визначають, порівнюючи дослідний зразок із стандартом.

3.1.3. Рестрикція ДНК.

Для рестрикції відбирають 10 мкг ДНК у пробірку типу "Епендорф", додають 3М розчин NaAc (№ 21) до кінцевої концентрації

0,15M (1/20 об'єму відібраного розчину ДНК) та 2,5 об'єми етанолу (№30). Витримують 1 год при (-20°C) і центрифугують при 10000 g та 4°C 20 хв на центрифугу типу Епендорф. Осад ДНК швидко промивають 70° етанолом (№31) підсушують на повітрі та розчиняють в 40 мкл дистильованої води. Додають 5 мкл 10*буферу для ферменту Bgl II (склад буфера визначається виробником), 20-30 одиниць ферменту Bgl II та воду до 50 мкл. Ретельно змішують та інкубують 3 години при 37°C. Для перевірки повноти рестрикції на агарозний гель наносять по 2 мкл зразків, змішавши з 2 мкл буферу №13 та 10 мкл води. Як маркер використовують ДНК фагу λ , розщеплену ферментом HindIII. При неповній рестрикції додають 30 од ферменту і продовжують інкубацію на 1-2 год. Неповна рестрикція може бути обумовлена недостатньою очисткою ДНК, низькою якістю ферменту чи буферу до нього, забрудненням посуду тощо. Після перевірки повноти рестрикції до зразків додають 0,25 об'єму 8M NH₄Ac (№16) (до концентрації 2M) та 2 об'єми етанолу. Витримують 1-2 год при -20°C та центрифугують при 10000g та 4°C 15хв. Осад швидко промивають холодним 70° етанолом (№31), підсушують на повітрі та розчиняють у 30 мкл води. Зразки наносять на препаративний агарозний гель або зберігають при -20°C.

3.1.5. Препаративний електрофорез.

Готують 0,9% агарозний гель (№12) і заливають планшет довжиною 10-15 см. Товщина гелю має бути 4-5 мм. Для проведення фореу камеру заповнюють 1*ТБЕ буфером (№11). Детальну інформацію про будову камери та умови проведення електрофорезу можна знайти в [1]. Вносять в лунки розщеплену ДНК кожного із зразків, що вивчаються, а також розщеплену при тих же умовах ДНК випадкової людини, як негативний контроль, та маркер молекулярної ваги, наприклад λ /HindIII. Електрофорез проводять 18 год при 60-80В. Гель про-

фарбують бромистим етидієм (№15) та фотографують на плівку "Мікрат-300" при оранжевому світлофільтрі.

3.1.6. Перенесення на фільтр.

Можливі кілька варіантів перенесення ДНК на фільтр. Це "блоттінг" за Саузерном, електроблоттінг, вакуумне перенесення та ін. Для двох останніх способів необхідні спеціальні прилади. Методи-ки перенесення ДНК з їх використанням можна звичайно знайти в документації до приладів.

Перенесення за Саузерном.

Для фіксації розділених в агарозі ДНК-фрагментів використовують нітроцелюлозні та нейлонові (капронові) мембрани з діаметром пор 0,2 - 0,45мкм. Нейлонові мембрани зручніші у використанні і дозволяють отримувати якісні картини.

Після фотографування гель обробляють 500мл 0,2М розчину HCl (№17) 10 хв. Промивають гель водою та занурюють в 500 мл денатуруючого розчину №18 на 30 хв при м'якому погойдуванні. Промивши водою, гель обробляють нейтралізуючим розчином №19 два рази по 30 хв (по 500 мл розчину). По розміру гелю вирізають нейлоновий фільтр (! Всі процедури необхідно виконувати в гумових рукавичках або ж проводити маніпуляції, особливо з фільтром, за допомогою пінцетів!) та стос фільтрувального паперу товщиною 7-10 см (можна використовувати будь-який гігроскопічний папір чи інші матеріали, крім початкового шару 1 см). Готують 500-1000 мл 10*SSC (№20). На строго горизонтальній поверхні ставлять кювету, всередині якої розміщено столик з гладкою верхньою поверхнею, і збирають прилад для перенесення ДНК (детальний опис див в [1]). Розчин 10*SSC не повинен сягати верхньої поверхні столика. Важливо видалити всі пухирці повітря між столиком і ватманом 3ММ, ватманом і гелем, і особливо між гелем та мембраною. Зверху прикладають вантаж 0,5-1 кг. Перенесен-

ня триває 16-20 год. Після цього підсушують фільтр на повітрі та фіксують ДНК на мембрані прогріванням при 80°C протягом 2 год, бажано у вакуумі.

3.1.7. Мічення геномних зондів.

Робоча суміш складалась з 2 мкл (0,1-0,3 мкг) геномного зонду, 2 мкл 10*кратного буферу для полімерази Кленова, 12 мкл H₂O, 0,1 мкг розсіяної затравки - dNTP₍₆₎ , по 1 мкл 0,5 мМ дАТФ, дГТФ, дТТФ. Суміш прогривають 1-2 хв в киплячій воді та переносять на лід . Додають 50-100 μCi ³²P дЦТФ і 1мкл (1-2 од) полімерази Кленова, інкубують 30 хв при 37°C. Додають 1/2 об'єму 8М аммоній ацетату (№16) та 2 об'єми етанолу (№30). Інкубують 15 хв при кімнатній температурі і центрифугували 10 хв при 10000g. Осад розчиняють в 50 мкл H₂O.

3.1.8. Проведення гібридизації.

Фільтр з перенесеною на нього ДНК змочують в розчині № 20 і герметично запаюють в поліетиленовий пакет. Зрізавши кут в пакеті, додають розчин № 29 з розрахунку 10 мл на 400 см² фільтру, герметично заварюють та інкубують 18 год при 60°C. Додають зонд та інкубують 24 год при 60°C. Фільтр дістають з пакету та відмивають від надлишку зонду в розчині (№24) 3 рази в об'ємі 300 мл при кімнатній температурі. Фільтр підсушують на повітрі за захисним екраном і загортають в плівку типу Saran. В темноті закладають фільтр поміж двох листів рентгенівської плівки РМ-В у медичну рентгенівську касету з посилюючими екранами. Експонують плівку в залежності від активності зонду 2-20 діб. Проявляють одну плівку і в разі необхідності подовжують експозицію з другою плівкою.

3.2. Діагностика ХМЛ із застосуванням ПЛР.

3.2.1. Виділення лейкоцитів.

До 10 мл гепаринізованої крові обережно додають 2,5 мл 5% декстрану (№35). Розміщують пробірку під кутом 45° та витримують 30-40 хв у термостаті при 37°C. До 2 мл, відібраної верхньої фази (лейкоцитарної суспензії) додають (на льоду) 6 мл охолодженої дистильованої води та через 40 сек - 2 мл 3,5%NaCl (№38). Центрифугують 20 хв при 4500 g. Осад ресуспендують в 0,9%NaCl (№39), та повторно центрифугують протягом 10 хв при 4500 g.

3.2.2. Виділення РНК.

Гомогенізують лейкоцитарний осад (10^8 клітин) у центрифужних пробірках з 1 мл лізуючого розчину Д (№36) при кімнатній температурі. Переносять суміш на лід та додають (обережно перемішуючи суміш після додавання кожного з компонентів) 0,1 мл 2М NaAc (№40), 1 мл водонасиченого кислого фенолу (№37) та 0,2 мл “хлороформу” (№23). Суміш обережно струшують до отримання однорідної суспензії і витримують 15 хв на льоду. Центрифугують на 10000g 20 хв 4°C. Відбирають верхню фазу, що містить РНК, в іншу пробірку та додають 1 мл ізопропалолу (№41). Витримують 1 год при -20°C. Центрифугують на 10000g протягом 15 хв при 4°C. До осаду РНК додають 0.3 мл розчину Д (№36) та 0,3 мл ізопропалолу (№41). Витримують 1 год при -20°C та центрифугують при 10000g та 4°C протягом 15 хв. Осад швидко промивають 75° етанолом (№31) (за необхідності центрифугують при 10000g та 4°C протягом 5 хв) і висушують у вакуумній сушці. Отриману РНК розчиняють в 100 мкл стерильної води і розливши на аліквоти зберігають при -20°C. В разі довгострокового зберігання до розчину РНК додають NaAc (№40) до кінцевої концентрації 0,3М та 2 об’єми етанолу (№ 30) і зберігають при - 70°C.

3.2.3 Праймери для діагностики ХМЛ.

В роботі були використані олігонуклеотидні праймери [2,3]:

A₁ 5' - ТГА.ТТА.ТАГ.ЦЦТ.ААГ.АЦЦ.ЦГГ.А - 3'

A₂ 5' - ГГТ.ЦАТ.ТТТ.ЦАЦ.ТГГ.ГТЦ.ЦАГ.Ц - 3'

A₃ 5' - ТЦА.ГАЦ.ЦЦТ.ГАГ.ГЦТ.ЦАА.АГТ.Ц - 3'

що комплементарні послідовностям 2-го екзона *ABL* гена і необхідні для отримання кДНК та служать 3' праймерами в полімеразній ланцюговій реакції;

B₁ 5' - ГАА.ГТГ.ТТТ.ЦАГ.ААГ.ЦТТ.ЦТЦ.Ц - 3'

B₂ 5' - ГГА.ГЦТ.ГЦА.ГАТ.ГЦТ.ГАЦ.ЦАА.Ц - 3',

що гомологічні послідовності другого екзона (b₂) *M-bcr* локусу гена *BCR* і використовуються як 5' праймери в ПЛР;

2-II 5' - ГЦТ.ГАА.ГГГ.ЦТТ.ЦТТ.ЦТТ.ТАТ.ТГА.ТГ - 3'

3-II 5' - ГЦТ.ГАА.ГГГ.ЦТТ.ТТГ.ААЦ.ТЦТ.ГЦТ.ТА - 3'

що використовуються для виявлення злитих ділянок 2-го екзона (b₂) *M-bcr* гена, 3-го екзона (b₃) *M-bcr* гена з II екзоном *ABL* гена.

3.2.4. Синтез кДНК та проведення ПЛР.

кДНК отримують за допомогою зворотної транскриптази *AMV*. Система для проведення реакції складається з 1-5 мкг РНК, 5-10 од РНазіну, 1мМ кожного з dNTP, 10 рМ праймера A₁, буфера для зворотної транскриптази та 5-10 од ферменту. Загальний об'єм суміші складав 40 мкл. Реакцію проводять 45 хв при 42°C. Аліквоти реакційної суміші (5 - 10 мкл) використовують для проведення ампліфікації.

Реакцію ампліфікації проводять в стандартній реакційній суміші, рекомендованою виробником ферменту-полімерази з використанням праймерів A₁ та B₁ (по 1 мкл кожного з праймерів A₂₆₀=1). Для виключення випаровування зразків на реакційну суміш нашаровують мінеральне масло (№32). На першому етапі проводили 35 циклів ампліфікації за таких умов: 94°C-18 сек, 55°C-18 сек, 72°C-1 хв. Далі з отриманої суміші відбирають 1-5 мкл та проводять другий етап ПЛР (з використанням праймерів B₂ та A₃) за таких умов: 94°C - 24 сек, 58°C -

18 сек, 72°C - 1 хв. Продукти ампліфікації аналізували в 1,5% агарозному гелі.

4. Молекулярно-генетична діагностика ХМЛ.

4.1. Використання геномних зондів для детекції

Ph'-хромосоми.

Як вже згадувалось вище, першим цитогенетичним маркером пухлинного росту була маленька G-пофарбована хромосома, що була названа Ph' (філадельфійською) хромосомою [4]. Утворення даної хромосоми зумовлено реципрокною транслокацією між 9 та 22 хромосомами t(9;22) (q34;q11). На молекулярному рівні захворювання зумовлено утворенням злитого BCR/ABL гена (5' ділянка гена BCR поєднується з 3' ділянкою гена ABL). При ХМЛ продуктом трансляції є BCR/ABL білок з ММ 210кДа (р210), що нараховує 927 чи 902 амінокислотних залишків гена BCR та 1097 а.з. гена ABL [2]. Химерні білки характеризуються зміненою тирозинкіназною активністю [5], що і визначає розвиток першого етапу ХМЛ. При утворенні філадельфійської хромосоми відбувається розрив у двох ділянках гена BCR: M-bcr (major breakpoint cluster region) розміром 5,8 т.п.н. та m-bcr (minor breakpoint cluster region) - ділянка першого інтрона гена BCR (приблизно 20 т.п.н.) [2,6,7]. Розриви у ділянці M-bcr виявляються у всіх випадках виникнення ХМЛ, а також приблизно 50% випадків ГЛЛ. В той же час розриви у ділянці m-bcr призводять переважно до розвитку ГЛЛ. Причини подібних розбіжностей на сьогодні не відомі. Розриви гена Abl відбуваються на ділянці довжиною близько 200 т.п.н. (між I та II екзонами). Наявність розривів в ділянці M-bcr робить можливим, при використанні відповідних зондів, детектувати зміни в структурі даного регіону. Ми використовували два геномних зонди: 5'-BCR зонд, що являє собою клонований BglIII/ HindIII фрагмент M-bcr, розміром 2 т.п.н.; та 3'-BCR зонд (BglIII/HindIII фрагмент, розміром 1,2 т.п.н.), що був клонований в рSV-

Т.П.Н.	1	2	16
5,6	—		
4,8	—	—	

2. Зонди були люб'язно надані К.Бартрамом (Ulm, ФРН). На рисунку представлено результати гібридизації рестрикованої BglIII геномної ДНК з 3'-BCR зондом.

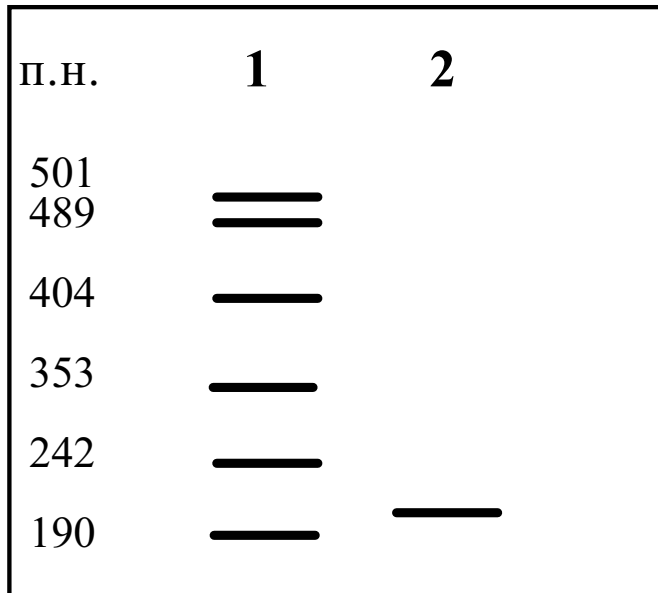
Наявність нормальної 22 хромосоми зумовлює появу

одного фрагмента розміром 4,8 т.п.н. (доріжка 2), в той час наявність філадельфійської хромосоми (розрив в ділянці M-bcr) зумовлює появу додаткового фрагменту, в даному випадку 5,6 т.н. (доріжка 1). Зробивши додаткову рестрикцію ДНК ферментом BamHI та провівши гібридизацію з 5'bcg зондом можна локалізувати ділянку розриву в M-bcr. Питання про те, наскільки прогностично важливим для перебігу захворювання має точка розриву в ділянці M-bcr на сьогодні залишається відкритим [6,7].

4.2.ПЛР діагностика філадельфійської хромосоми.

Як згадувалось вище, розриви в BCR та ABL генах можуть відбуватися на значних за розміром ділянках, що робить проблематичним застосування ДНК ПЛР технології. В той же час, з врахуванням того, що BCR/ABL мРНК мають розмір 8,6 та 7 т.п.н.[2,8] та включають злиті екзони I гена BCR та II гена ABL (п.н. при ГЛЛ) та 13, 14 екзони гена BCR та II екзоном ABL гена при ГЛЛ та ХМЛ), можна використовувати ПЛР для встановлення цих змін. Для отримання кДНК застосовували -праймери A₁, A₂. Як було зазначено в розділі 3, перший етап ампліфікації (30 циклів), що проводиться використанням праймерів A₁ та B₁, звичайно не дає такої кількості продукту, яка необхідна для візуального виявлення в агарозному гелі. Даний ампліфікат можна виявити за допомогою гібридизації з міченими ³²Pγ-АТФ зондами 2-II, 3-II, що виявляють ділянки злиття BCR та ABL екзонів. Проведення другого ет-

апу ПЛР, з використанням праймерів A_2 чи A_3 та B_2 , дозволяє виявити ампліфікати без проведення гібридизації та локалізувати точку розриву гена BCR. На рисунку представлено результати такої ампліфікації.



На доріжку 1 нанесено маркер - ДНК рUC19, розщепла ферментом MspI. В даному випадку було виявлено фрагмент розміром 200 п.н. (доріжка 2), тому з врахуванням розміщення праймерів можна стверджувати, що в даному випадку розрив в гені M-bcr має місце між 3 та 4 екзонами, тобто має місце

b_3/a_2 транслокація.

Обидва методи (використання геномних зондів та ПЛР) доповнюють один одного. Однак слід відзначити їх різну потенційну чутливість. Так використання мічених ізотопами геномних зондів дає змогу детектувати клітини з Ph'-хромосоною, коли їх кількість сягає 2-5% від загальної кількості мієлоїдних клітин у периферійній крові. В той час полімеразна ланцюгова реакція дає можливість визначити значно меншу кількість (приблизно 10^{-4} - 10^{-5}) клітин з Ph'-хромосоною.

Таким чином, запропоновані методи детекції клітин із Ph'-хромосоною дозволяють:

1. Визначити присутність мінімальної кількості (10^{-4} - 10^{-5}) патологічних клітин з Ph'-хромосоною у периферійній крові хворих на ХМЛ.
2. Діагностувати цитогенетичну ремісію у хворих на ХМЛ.

3. Прогнозувати подальший перебіг ХМЛ, оцінюючи кількість залишкових патологічних клітин у переферійній крові хворих.
4. Оцінювати ефективність лікування ХМЛ за темпами зменшення у периферійній крові хворих клітин із Ph'-хромосомою.

КРИТЕРІЇ ЕФЕКТИВНОСТІ

Використання у клінічній практиці геномних зондів мічених ізотопами та полімеразної ланцюгової реакції буде сприяти оптимізації діагностично-лікувального процесу, зниженню частоти розходжень діагнозу, зменшенню частоти загострень патологічного процесу, адекватному визначенню прогнозу різних стадій хронічного мієлолейкозу.

Література.

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование // Москва, "Мир".-1984, 480 с.
2. E.S.Kawasaki, S.S.Clark, M.Y.Coyne et al Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, V.85, N15, P.5698-5702.
3. Maurer J., Janssen J., Thiel E., et al. Deletion of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction // The Lancet.-1991.-337, N 8749.-P.1055-1058.
4. Nowell P.C., Hungerford D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // Science.-1960.-132, P.1497-1499.
5. Daley G.Q., Ben-Neriah Y. Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of the Philadelphia chromosome positive human leukemia // Adv. Cancer Res.-1991.-57, P.151-184.
6. Милс К.И. Ген BCR/ABL при хроническом миелолейкозе // Гематология и трансфузиология.-1993.-38, С.3-7.
7. Туркина А.Г., Домнинский Д.А., Покровская Е.С., и др. Оценка прогностической значимости структуры хромосомной транслокации t(9;22) при хроническом миелолейкозе // Гематология.-1993, N 3.-С.8-11.
8. Г.Д.Телегеев, М.В.Дибков, М.В.Божко, Н.М.Третьяк, С.С.Малюта Використання молекулярно-біологічних методів для виявлення філадельфійської хромосоми у хворих на лейкози // Биополимеры и клетка.- 1996 Т.12. №6, С.63-68.