

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра
Д.Л.Пиневич
26 декабря 2019 г.
Регистрационный № 133-1119

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ С
ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

АВТОРЫ: Герасимович В.Д., Кушнерова Е.В., Пахомова И.В., Волочник Е.В., к.б.н.
Мовчан Л.В., Мигас А.А., Наумович М.Г., к.м.н. Баровская Ю.А.,
к.б.н. Белевцев М.В., д.м.н, профессор, член-корр. НАН Беларуси Алейникова О.В.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

06.12.2019

Регистрационный № 133-1119

**МЕТОД ОЦЕНКИ ОСТАТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: В. Д. Герасимович, Е. В. Кушнерова, И. В. Пахомова, Е. В. Волочник,
канд. биол. наук Л. В. Мовчан, А. А. Мигас, М. Г. Наумович, Ю. А. Баровская,
канд. биол. наук М. В. Белевцев, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси
О. В. Алейникова

Минск 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- DB — лизирующий буфер (Digestion buffer)
PBS — натрий-фосфатный буфер (Phosphate buffered saline)
RCLB — буфер, лизирующий эритроциты (Red cell lysis buffer)
АСО-ПЦР — аллель-специфическая полимеразная цепная реакция
ВПС — высокопроизводительное секвенирование
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
КМ — костный мозг
МНК — моноклеарные клетки
ОМЛ — острый миелоидный лейкоз
ПЦР — полимеразная цепная реакция
п.о. — пар оснований
Taq ДНК-полимераза — термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза
ФСБ — фосфатно-солевой буфер
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки остаточных опухолевых клеток у детей с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) с использованием высокопроизводительного секвенирования.

Генетический скрининг соматических мутаций по заданному генетическому профилю с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования позволяет идентифицировать клон-специфичные мутационные изменения, которые выступают в качестве молекулярных маркеров для мониторинга содержания остаточных опухолевых клеток в костном мозгу на различных этапах терапевтического процесса.

Метод может рассматриваться в качестве лабораторного теста первой линии диагностики ОМЛ на момент постановки диагноза или рецидива заболевания. Клон-специфичный метод детекции остаточных опухолевых клеток будет использован в сочетании с общепринятыми диагностическими инструментами, основанными на иммунофенотипе опухолевого клона и наличии рекуррентных молекулярно-генетических характеристик (экспрессия химерных онкогенов, внутренняя тандемная дупликация гена *FLT3*) (приложение 1).

Инструкция предназначена для использования в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику болезней крови и кроветворных органов (МКБ-10), а также для врачей лабораторной диагностики, врачей-гематологов, врачей-онкологов, врачей-иммунологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с онкогематологическими заболеваниями.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Нестерильные одноразовые перчатки.
2. Дозаторы (0,5–10 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл).
3. Наконечники для дозаторов (объем от 10 до 1000 мкл).
4. Стрипы (объем 0,2 мл).
5. Эппендорфы (0,2–1,5 мл).
6. Пробирки (объем 15 мл).
7. Стеклянная посуда.
8. 96-луночные планшеты с низким профилем.
9. Оптические пленки для планшетов.
10. Магнитная подставка для пробирок и планшетов.
11. Морозильная камера (-20 °С)
12. Холодильник (4 °С).
13. Световой микроскоп.
14. Камера Горяева.
15. Вортекс.
16. Микроцентрифуга с охлаждением на 14 000 об/мин.
17. Термошейкер.
18. Спектрофотометр.
19. Флуориметр.
20. ПЦР-амплификатор.

21. ПЦР-амплификатор для ПЦР в режиме реального времени.
22. Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.
23. Микроволновая печь.
24. Лабораторные весы.
25. Документирующая система для визуализации результатов электрофореза.
26. Прибор для капиллярного электрофореза.
27. Прибор для прямого секвенирования по Сенгеру.
28. Прибор для высокопроизводительного секвенирования.

Реактивы

1. Натрий-фосфатный буфер.
2. Буфер, лизирующий эритроциты.
3. Градиент плотности HISTORAUQUE-1077.
4. Трипановый синий.
5. Лизирующий буфер.
6. Изопропанол.
7. Ацетат аммония, 8М.
8. Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).
9. Фосфатно-солевой буфер (рН 7,2-7,4).
10. Этанол, 70 %.
11. Этанол, 96 %.
12. Вода деионизированная.
13. Магнитные шарики для очистки ДНК-библиотек и их селекции по размерам продукта.
14. Водный раствор гидроксида натрия, 10нМ.
15. Набор реагентов для пробоподготовки библиотек для высокопроизводительного секвенирования по заданному генетическому профилю.
16. Набор реагентов для высокопроизводительного секвенирования.
17. Набор индексов для пулирования образцов.
18. Набор реагентов для измерения концентрации ДНК методом флуоресцентного анализа.
19. Набор реагентов для капиллярного электрофореза с диапазоном детекции от 50 до 7000 пар оснований.
20. Внутренний контроль для оценки качества запуска высокопроизводительного секвенирования.
21. Таq ДНК-полимераз.
22. Праймеры для амплификации включенных в панель генов.
23. 5x буфер для ПЦР.
24. Нуклеозидтрифосфаты (дНТФ), 25 мМ.
25. Хлорид магния, 25 мМ.
26. Агароза.
27. Бромистый этидий.
28. Маркеры молекулярного веса.
29. Набор реагентов для прямого секвенирования по Сенгеру.

30. 2х готовая смесь для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBER Green I и ДНК-полимеразой с горячим стартом.

31. Набор праймеров для аллель-специфической ПЦР.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Забор материала (костный мозг) осуществляют для всех пациентов с ОМЛ при первичной диагностике. Исследование осуществляют в случае, если другие молекулярные мишени опухолевых клеток (химерные онкогены, *FLT3-ITD*) не были обнаружены, также необходимо получить образец нормальной ткани данного пациента (буккальный эпителий).

Схема метода включает:

Выделение мононуклеарных клеток костного мозга

Костный мозг в объеме 2–3 мл разводят раствором PBS в соотношении 1:3. Полученную суспензию наслаивают на градиент плотности Histopaque-1,077 (SIGMA, США) объемом $\frac{1}{2}$ от объема клеточной суспензии и центрифугируют 20 мин при 400 g при медленном разгоне и торможении ротора. Кольцо мононуклеарных клеток переносят в пробирку и лизируют эритроциты в 15 мл RCLB 10 мин при 400 g, после чего сливают супернатант. К клеточному осадку добавляют 15 мл PBS и центрифугируют в течение 10 мин при 400 g, процедуру повторяют дважды. Затем подсчитывают количество клеток с помощью камеры Горяева.

Экстракция геномной ДНК

Для экстракции геномной ДНК 5×10^6 клеток лизируют в 1 мл DB-буфера и инкубируют при 37 °C в течение 1–24 ч до образования гомогенного лизата. К лизату добавляют равный объем фенол-хлороформа, центрифугируют 1 мин при максимальном ускорении. В водную фазу добавляют равный объем изопропанола, вортексируют и центрифугируют при максимальном ускорении 20 мин с охлаждением. Если осадок достаточно крупный и мутно-белый, то необходимо очистить его от белка путем добавления DB-буфера (500 мкл), инкубировать при 55 °C до полного растворения. Затем добавляют равный объем ацетата аммония (8M) и инкубируют на льду в течение 5 мин. Центрифугируют 10–20 мин при максимальном ускорении с охлаждением, после чего супернатант переносят в новую пробирку и проводят этап с добавлением изопропанола, описанный выше. Далее к осадку добавляют 1 мл 80 % этанола и центрифугируют 5 мин при максимальном ускорении. Осадок оставляют при комнатной температуре до полного испарения этанола и растворяют в 100 мкл воды высокой степени очистки, после чего измеряют концентрацию ДНК методом флуориметрии, а качество и чистоту выделенной ДНК — методом спектрофотометрии.

Высокопроизводительное секвенирование по заданному генетическому профилю

Пробоподготовку образцов геномной ДНК для ВПС по заданному генетическому профилю производят согласно инструкции производителя. Для каждого пациента ВПС выполняется для образца ДНК, полученного из МНК КМ и образца ДНК — из нормальных клеток (клетки буккального эпителия) для дальнейшей фильтрации вариантов. Подготовка библиотеки для таргетного секвенирования, как правило, включает этапы, обеспечивающих фланкирование целевых регионов, лигирование технических последовательностей и амплификацию фрагментов библиотеки.

Подготовка ДНК-библиотеки для таргетного высокопроизводительного секвенирования с использованием TruSight Myeloid panel (54 гена)

Перечень включенных в панель генов представлен в приложении 2.

Для приготовления реакционной смеси для гибридизации к 10 мкл ДНК (5 нг/мкл) необходимо добавить 5 мкл смеси олигонуклеотидов, комплементарных фланкирующим регионам генов, включенных в используемую панель, TruSight Oligos (Illumina, США), перемешать и осадить путем центрифугирования в течение 1 мин при 1000 g. К полученной смеси добавляют 35 мкл OHS2 (Oligo Hybridization for Sequencing 2), TruSight Myeloid sequencing Panel (Illumina, США). Реакционную смесь перемешивают и осаждают в течение 1 мин при 1000 g.

Гибридизация олигонуклеотидов осуществляется путем инкубации реакционной смеси при 40 °С в течение 80 мин после предварительной тепловой денатурации (95 °С, 1 мин).

Очистку реакционной смеси от свободных олигонуклеотидов и лигирование связавшихся с матрицей олигонуклеотидов выполняют с использованием фильтрационного планшета Filter Plate Unit (Illumina, США).

Реакционную смесь в объеме 50 мкл переносят на фильтрационный планшет после предварительного промывания фильтров планшета с использованием промывочного буфера Stringent Wash 1 (SW1) (Illumina, США). Далее планшет центрифугируют в течение 5 мин при 2400 g. Дважды промывают SW1 буфером, а также универсальным буфером UB1 (Illumina, США) в объеме 45 мкл.

Для лигирования связавшихся олигонуклеотидов на фильтрационный планшет добавляют реакционную смесь Extension Ligation Mix 4 (ELM4) (Illumina, США) и инкубируют в течение 45 мин при 37 °С.

После гибридизации планшет центрифугируют при 2400 g в течение 5 мин, добавляют по 25 мкл 50 мМ NaOH и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин. Раствор 50 мМ NaOH, содержащий элюированные фрагменты ДНК, переносят в пробирки для ПЦР, добавляют по 4 мкл (Index i5 Adapters и Index i7 Adapters (Illumina, США)) технических последовательностей, содержащих праймеры для секвенирования, уникальные индексы для идентификации образцов после пулирования, а также адаптеры, необходимые для прикрепления фрагментов библиотеки на ячейке для секвенирования. К полученной смеси добавляют по 22 мкл смеси для ПЦР (на 8 образцов: 3,5 мкл

TDP1 и 175 мкл PMM2 (Illumina, США)). Перемешивают и центрифугируют в течение 1 мин при 1000 g. Условия лигирования адаптеров и амплификации фрагментов представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Условия амплификации фрагментов библиотеки для высокопроизводительного секвенирования

Температура, °С	Время элонгации	Количество циклов
95	3 мин	1
95	30 с	27
66	30 с	
72	1 мин	
72	5 мин	1
10	∞	–

Очистку ПЦР-продукта осуществляют с помощью магнитных шариков. Магнитные шарики AMPure XP beads (Beckman Coulter, США) в объеме 45 мкл добавляют к ПЦР-смеси, перемешивают и инкубируют 10 мин при комнатной температуре. Супернатант отбирают после инкубации планшета на магнитном штативе в течение 2 мин. Не снимая с магнитного штатива, шарики дважды промывают в 200 мкл 80 % этанола, после чего инкубируют 10 мин при комнатной температуре до полного его испарения. Далее планшет снимают с магнитного штатива, добавляют 30 мкл буфера для элюирования, перемешивают и инкубируют 2 мин при комнатной температуре. Планшет устанавливают на магнитный штатив на 2 мин и переносят супернатант, содержащий фрагменты библиотеки, в новую пробирку. Методом флуориметрии измеряют концентрации ДНК. Длину фрагментов библиотеки оценивают с помощью капиллярного электрофореза. Средняя длина фрагментов для используемой панели равна 350 п.о. При наличии на электрофорезе дополнительного пика, равного 150-200 п.о., выполняют повторную очистку на магнитных шариках.

ВПС образцов КМ пациентов с ОМЛ осуществляют с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina, США), обеспечивающего секвенирование 15 Гб нуклеотидов. Для достижения оптимального покрытия (более 500 прочтений на один нуклеотид) оптимальным количеством образцов на один запуск прибора является 8 образцов.

Далее молярную концентрацию каждого образца ДНК доводят до 4 нМ и смешивают образцы в равном соотношении (формула 1 для расчета молярной концентрации):

$$\frac{(\text{concentration in ng/}\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} * \text{average library size})} \times 10^6 = \text{concentration in nM} \quad (1)$$

Библиотеку денатурируют с использованием 0,2н NaOH (5 мкл пулированной библиотеки смешивают с 5 мкл NaOH, инкубируют 5 мин при комнатной температуре). Далее добавляют 990 мкл NT1 буфера и 3 % 20 пМ PhiX контроля (Illumina, США). Полученную библиотеку разводят до 10-16 пМ и

вносят в картридж для секвенирования. Секвенирование выполняют на приборе MiSeq (Illumina, США).

Приготовление ДНК-библиотеки для таргетного высокопроизводительного секвенирования с использованием QIAseq Targeted DNA Panel (141 ген)

Набор QIAseq Targeted DNA Panel (QIAGEN, Нидерланды) позволяет подготовить ДНК-библиотеку для секвенирования 141 гена, мутации в которых ассоциированы с миелоидными неоплазиями (приложение 3). На первом этапе готовят реакционную смесь для фрагментации (таблица 2).

Таблица 2. — Состав реакционной смеси для фрагментации

Компонент	Количество
ДНК	10-40 нг
Fragmentation Buffer, 10x	2,5 мкл
FERA Solution	0,75 мкл
Вода	<20 мкл
Всего	20 мкл

Далее добавляют 5 мкл Fragmentation Enzyme Mix в каждую пробирку и амплифицируют образцы согласно программе, представленной в таблице 3.

Таблица 3. — Условия амплификации для фрагментации

Шаг	Температура отжига, °С	Время, мин
1	4	1
2	32	24
3	72	30
4	4	∞

Затем пробирки переносят на лед и готовят смесь для лигирования адаптеров согласно таблице 4.

Лигирование выполняют в термоциклере при температуре 20 °С 15 мин. Далее производят очистку образцов. В образцы добавляют 50 мкл воды и 100 мкл QIAseq Beads. Перемешивают пипетированием, инкубируют 5 мин при комнатной температуре. По истечении времени инкубации планшет с образцами переносят на магнитный штатив на 10 мин, после чего удаляют супернатант и добавляют 200 мкл свежеприготовленного 80 % этанола. Промывку этанолом осуществляют дважды. Планшет оставляют на 10 мин на магнитном штативе при комнатной температуре для полного испарения этанола.

Таблица 4. — Реакционная смесь для лигирования адаптеров

Компонент	Количество, мкл
Фрагментированная ДНК	25
Буфер для лигирования, 5x	10
IL-N7 адаптер	2,8
ДНК-лигаза	5
Раствор для лигирования	7,2
Вода	<50
Всего	50

Далее добавляют 52 мкл воды и перемешивают пипетированием. Планшет инкубируют на магнитном штативе до полной прозрачности раствора. Далее 50 мкл супернатанта переносят в чистый планшет и добавляют 50 мкл QIAseq Beads, инкубируют 5 мин при комнатной температуре.

Планшет устанавливают на магнитный штатив на 5 мин, после чего удаляют супернатант и дважды отмывают магнитные шарики в 200 мкл 80 % этанолом, после чего образцы оставляют на 10–15 мин при комнатной температуре для полного испарения этанола.

Добавляют 12 мкл воды к образцам и перемешивают пипетированием. Планшет инкубируют на магнитной подставке до полной прозрачности раствора, после чего супернатант в объеме 9,4 мкл переносят в чистый планшет. Состав реакционной смеси для обогащения и программа амплификации указаны в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. — Состав реакционной смеси для обогащения

Компонент	Количество, мкл
ДНК-фрагменты, лигированные с адаптерами	9,4
TEPCR buffer, 5x	4
QIAseq Targeted DNA Panel	5
IL-Forward primer	0,8
HotStarTaq DNA Polymerase	0,8
Всего	20

Таблица 6. — Условия амплификации для обогащения

Шаг	Время	Температура, °C	Количество циклов
Общая денатурация	13 мин	95	1
	2 мин	98	
Денатурация Элонгация	15 с	98	8
	10 мин	68	
Досинтез	5 мин	72	1
Охлаждение	5 мин	4	
Охлаждение	∞	4	

После завершения реакции обогащения к образцу добавляют воду до конечного объема 100 мкл. Далее добавляют 100 мкл QIAseq Beads. Смесь пипетируют и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Планшет устанавливают на магнитный штатив на 5 мин.

После удаления супернатанта необходимо дважды отмыть осадок в 200 мкл 80 % этанола, далее необходимо инкубировать 10 мин при комнатной температуре до полного испарения этанола. Далее планшет убирают с магнитного штатива и элюируют ДНК в 16 мкл воды. Смесь пипетируют и возвращают планшет на магнитный штатив до полной прозрачности раствора, после чего супернатант в объеме 13,4 мкл в чистый планшет. Далее производят амплификацию библиотеки и добавление панель-специфичных адаптеров. Состав реакционной смеси указан в таблице 7. Условия реакции амплификации указаны в таблице 8.

Таблица 7. — Состав реакционной смеси Universal PCR

Компонент	Количество, мкл
Обогащенная ДНК	13,4
UPCR Buffer, 5x	4
IL-Universal Primer	0,8
IL-S502 Index Primer	0,8
HotStarTaq DNA Polymerase	1
Всего	20

Таблица 8. — Условия амплификации Universal PCR

Шаг	Время	Температура, °C	Количество циклов
Общая денатурация	13 мин	95	1
	2 мин	98	
Денатурация	15 с	98	22
Элонгация	2 мин	60	1
Досинтез	5 мин	72	
Охлаждение	5 мин	4	
Охлаждение	∞	4	

После завершения реакции амплификации к образцу добавляют воду до конечного объема 100 мкл. Затем к образцу добавляют 100 мкл QIAseq Beads и инкубируют 5 мин при комнатной температуре.

Планшет устанавливают на магнитный штатив, дважды отмывают в 200 мкл 80 % этанола и оставляют сушиться 10 мин при комнатной температуре.

Далее планшет снимают с магнитного штатива и элюируют ДНК в 30 мкл воды. Далее планшет возвращают на магнитный штатив до полной прозрачности раствора, после чего отбирают 28 мкл супернатанта и переносят в чистый планшет. Библиотеку разводят до концентраций от двух 2 нМ до 4 нМ.

Далее образцы пулируют в эквимольных количествах для получения одинаковой глубины покрытия.

Библиотеку разводят до концентрации 1,25 нМ. Далее денатурируют ДНК путем смешивания 10 мкл библиотеки ($C = 1,25 \text{ нМ}$) с 10 мкл NaOH (80 %, свежий) и инкубирования в течение 5 мин при комнатной температуре.

С помощью гибридационного буфера образец разбавляют до концентрации 12,5 пМ (конечный объем — 600 мкл). Контрольную ДНК-библиотеку PhiX разводят до концентрации 4 нМ, для чего смешивают 3 мкл TRIS-HCl (pH = 8,5) с 2 мкл PhiX (C = 10нМ). PhiX денатурируют путем добавления 5 мкл NaOH (0,2 н), после чего смесь осаждают и инкубируют при комнатной температуре 5 мин. Далее PhiX необходимо развести до концентрации 12,5 пМ. Для получения конечной библиотеки объемом 600 мкл, содержащей 3 % PhiX, смешивают 582 мкл ДНК-библиотеки и 18 мкл PhiX. Готовую ДНК-библиотеку загружают в картридж и выполняют секвенирование на приборе MiSeq (Illumina, США).

Биоинформационный анализ результатов высокопроизводительного секвенирования

Первичный биоинформационный анализ данных ВПС включает оценку основных параметров запуска и демультиплексирование полученных прочтений с последующим формированием файлов формата fastq для каждого образца библиотеки. Данный этап предполагает использование двух основных программ: MiSeq Reporter и Sequencing Analysis Viewer (SAV) (Illumina, США).

Анализ и обработка сырых данных

Качественная и количественная характеристика прочтений для каждого образца производится с использованием программы FastQC v.0.11.5 (исходные данные — файлы с расширением FASTQ). В процессе анализа учитываются следующие показатели: качество по шкале Phred ($Q \geq 30$) для каждого цикла; качество определения нуклеотидов в каждой клетке проточной ячейки; процентное соотношение нуклеотидов в процессе секвенирования; длина последовательности; количество дубликатов (часто повторяющихся последовательностей) и отсутствие адаптеров.

Удаление технических последовательностей (адаптеров), фильтрация по качеству ($Q \geq 25$) и длине прочтений (не менее 80 п.о.) осуществляется с использованием программы Trimmomatic с последующей оценкой качества отсортированных FASTQ файлов.

Выравнивание прочтений и вызов вариантов

Выравнивание последовательностей осуществляется на геноме версии hg19 (UCSC) с использованием программы BWA-MEM для парноконцевых прочтений. Работа с выравниваниями (SAM/BAM-форматами), включающая сортировку, индексацию, фильтрацию по качеству и маркирование дубликатов, поиск вариантов, отличающихся от референсной последовательности (генерирование файла с расширением vcf), выполняется с использованием программ SAMtools v.1.4-18 и GATK.

Оценка покрытия осуществляется с использованием программ SAMtools и IGV. Удовлетворительным покрытием для соматических мутаций является не менее 500 прочтений на нуклеотид. Вызов вариантов выполняется при частоте альтернативного варианта не менее 5 %.

Аннотация вариантов и интерпретация их клинического значения

Аннотация вариантов выполняется с использованием программ Annovar и VariantStudio (Illumina, США).

Фильтрация аннотированных данных производится с учетом следующих показателей:

1. Сравнение вариантов, полученных для МНК КМ и клеток буккального эпителия. Варианты, выявленные в обоих образцах, исключаются.

2. Частота встречаемости в мировой и европейской популяциях (проект «1000 геномов», консорциум ExAC (Exome Aggregation Consortium)).

При значении частоты встречаемости более 1% идентифицируемое изменение считается не патогенным.

3. Локализация замены в геноме. Экзон и сплайс-варианты.

4. Тип мутации: исключают синонимичные замены. При отсутствии информации о патогенетической значимости варианта (отсутствие клинического значения), варианты типа «инделы со сдвигом рамки считывания» и «замены, приводящие к образованию преждевременного стоп-кодона» считаются патогенетически значимыми. В отношении несинонимичных замен, при условии отсутствия информации о клинической значимости, учитываются данные предикторов патогенности, таких как PolyPhen-2, SIFT и др.

Верификация клон-специфичных мутаций методом прямого секвенирования по Сенгеру

Подбор праймеров осуществляется с использованием программного обеспечения Primer3Plus, а также онлайн базы данных Ensembl. В качестве референсных последовательностей используется сборка генома человека версии GRCh37. Праймеры должны быть применимы для амплификации фрагмента гена, содержащего выявленную с помощью ВПС мутацию.

В состав реакционной смеси для ПЦР входят: 5x ПЦР-буфер (5,5 мкл), 25 mM MgCl — 1,25, 25 mM дНТФ — 0,2 мкл, Taq ДНК-полимераза (5 ед./мкл) — 0,2 мкл, праймеры — по 1 мкл, ДНК матрица — 100 нг, вода — до 25 мкл. После амплификации выполняют визуализацию результатов ПЦР с использованием электрофореза в агарозном геле. Концентрацию ПЦР-продукта измеряют методом флуориметрии.

Секвенирование целевых последовательностей осуществляется на анализаторе 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, США). В состав реакционной смеси для секвенирования входят следующие компоненты: 5x Sequencing Buffer — 1 мкл, Cycle Sequencing RR-100 v3.1 — 1 мкл, праймер (3,2 пмоль/мкл) — 0,5 мкл, ДНК матрица — 10 нг, лабораторная вода высокой степени очистки — до 10 мкл. Очистка реакции секвенирования производится методом спиртовой преципитации. Биоинформационный анализ выполняют с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2.0 (Applied Biosystems, США), BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (США), NCBI BLAST и Ensembl.

Мониторинг МОБ с использованием АСО-ПЦР

Подбор аллель-специфичных праймеров

Набор праймеров для детекции одной мутации состоит из трех элементов: праймер, комплементарный мутации; праймер, комплементарный участку последовательности дикого типа, в котором произошла мутация; праймер, комплементарный последовательности, не отличающейся нуклеотидным составом

у аллеля дикого типа и мутантного аллеля. Для создания праймеров необходимо знать точные координаты мутации, а также последовательность гена, окружающую мутацию, в диапазоне 300 п.н. со стороны 5'-конца и 3'-конца.

Координаты мутаций известны по результатам анализа данных таргетного ВПС ДНК, полученной при первичной диагностике. При помощи геномных браузеров IGV или Ensembl устанавливается окружение мутации.

При создании праймеров необходимо учитывать следующие рекомендации:

1. При создании аллель-специфичных праймеров для однонуклеотидной замены последний нуклеотид на 3'-конце праймера должен быть комплементарен этой замене в случае создания мутантного праймера или нуклеотиду, который подвергается замене в случае создания праймера дикого типа. Необходимо искусственно внести одинаковую однонуклеотидную замену в 4–5 нуклеотид с 3'-конца обоих аллель-специфичных праймеров (мутантного и дикого типа) для увеличения специфичности их отжига на соответствующей матрице.

2. Нуклеотидный состав пары аллель-специфичных праймеров должен быть отрегулирован таким образом, чтобы их теоретические температуры плавления не отличались более чем на 0,5 °С, что необходимо для соблюдения условия одинаковой эффективности амплификации обоих мишеней.

3. Общий праймер должен быть комплементарен последовательности, нуклеотидный состав которой одинаков для мутантного и аллеля дикого типа, а размер ампликона должен находиться в диапазоне 75-200 п.н. Температура плавления общего праймера не должна превышать температуру плавления пары аллель-специфичных праймеров более чем на 4 °С.

4. Следует избегать образования праймерами вторичных структур, гомо- и гетеродимеров.

5. Перед исследованием необходимо определить наиболее оптимальную температуру отжига праймеров путем постановки ПЦР в режиме реального времени с градиентом температур, используя ДНК здорового донора для выявления неспецифического отжига мутантного праймера на аллеле дикого типа, а в качестве положительного контроля — ДНК пациента, полученную при первичной диагностике.

6. Разница пороговых циклов: $Ct_{\text{(мутантный аллель, ДНК донора)}} - Ct_{\text{(дикий аллель, ДНК донора)}}$, должна быть не менее 17 циклов. В противном случае, если надлежащей специфичности отжига праймеров путем увеличения температуры отжига достичь не удалось, следует изменить последовательность праймеров.

Методика АСО-ПЦР и анализ результатов

1. Реакционная смесь в расчете на 1 реакцию (15 мкл) содержит: 7,5 мкл 2× готовой смеси для ПЦР с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green I и ДНК-полимеразой с горячим стартом; 0,75 мкл смеси прямого и обратного праймера (в концентрации по 6 пкмоль/мкл); 100 нг ДНК-матрицы; деионизированную воду до конечного объема.

2. На каждую точку наблюдения пациента необходимо выполнить 6 реакций: ДНК-матрица с праймерами дикого типа (триплет) и ДНК-матрица с праймерами мутантного типа (триплет).

3. При анализе каждой последующей точки необходимо одновременно

повторно анализировать образец ДНК, полученного на предыдущей точке наблюдения и производить оценку относительно него.

4. Реакционную смесь, содержащую необходимые компоненты, вносят в лунки 96-луночного планшета. Каждый запуск должен сопровождаться двумя отрицательными контролями и двумя контролями с ДНК здорового донора (с праймерами дикого типа и мутантного типа соответственно). Контроль с ДНК здорового донора необходим для определения границ специфичности мутантного праймера.

5. После покрытия оптической пленкой и осаждения реакционной смеси планшет загружают в амплификатор и запускают программу, представленную в таблице 9.

Таблица 9. — Программа амплификации АСО-ПЦР

Шаг	Активация ДНК-полимеразы, денатурация	50 циклов		Построение кривых плавления
		денатурация	отжиг, элонгация	
Температура	95 °С	95 °С	60 °С	Шаг: 0,5 °С (65–95 °С)
Время	15 мин	15 с	45 с + детекция сигнала	5 с + детекция сигнала

6. После завершения запуска результаты учитывают при соблюдении следующих условий: в отрицательном контроле отсутствуют продукты амплификации; во всех лунках, содержащих праймеры дикого типа и ДНК-матрицу, наблюдается рост целевого продукта; на графиках плавления во всех лунках, содержащих ДНК-матрицу, отсутствуют кривые, отличные от кривых плавления амплифицируемых фрагментов мутантного и дикого аллелей;

7. В случае, когда в лунке, содержащей ДНК донора и праймер мутантного типа, наблюдается рост неспецифичного продукта, результаты амплификации в образце пациента интерпретируют как отсутствие копий мутантного аллеля, если:

$$Ct_{(\text{мутантный аллель, донор})} - Ct_{(\text{мутантный аллель, пациент})} < 3,32 \text{ цикла.}$$

8. Процентное содержание копий мутантного аллеля в образце на каждой точке наблюдения определяют следующим образом:

Подсчет среднего арифметического пороговых циклов по лункам, содержащим праймер дикого типа и по лункам, содержащим праймер мутантного типа.

Подсчет разницы средних значений пороговых циклов:

$$\Delta Ct = Ct(\text{мутантный тип}) - Ct(\text{дикий тип})$$

Подсчет процентного содержания аллелей мутантного типа в образце по формуле 2:

$$MUT\% = \frac{1}{2^{\Delta Ct+1}} \times 100 \%. \quad (2)$$

В случае если реакция с праймером мутантного типа прошла в одной либо в двух лунках из трех, конечное значение доли мутантных аллелей следует умножить на 1/3 либо на 2/3 соответственно.

9. Динамика МОБ оценивается относительно полученного значения MUT% в том же запуске для предыдущей точки наблюдения. При изменении MUT% от предыдущей точки в пределах log10 делается вывод об отсутствии динамики.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствуют.

Алгоритм мониторинга минимальной остаточной болезни с определением необходимых временных точек для оценки содержания остаточных опухолевых клеток на различных этапах терапии



**Панель генов для определения соматических мутаций при остром
миелобластном лейкозе (54 гена)**

Название гена	Название гена	Название гена	Название гена
<i>ABL</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>KDM6A</i>	<i>RAD21</i>
<i>ASXL1</i>	<i>ETV6/TEL</i>	<i>KIT</i>	<i>RUNX1</i>
<i>ATRX</i>	<i>EZH2</i>	<i>KRAS</i>	<i>SETBP1</i>
<i>BCOR</i>	<i>FBXW7</i>	<i>MLL</i>	<i>SF3B1</i>
<i>BCORL1</i>	<i>FLT3</i>	<i>MPL</i>	<i>SMC1A</i>
<i>BRAF</i>	<i>GATA1</i>	<i>MYD88</i>	<i>SMC3</i>
<i>CALR</i>	<i>GATA2</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SRSF2</i>
<i>CBL</i>	<i>GNAS</i>	<i>NPM1</i>	<i>STAG2</i>
<i>CBLB</i>	<i>HRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>TET2</i>
<i>CBLC</i>	<i>IDH1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>TP53</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>IDH1</i>	<i>PHF6</i>	<i>U2AF1</i>
<i>CEBPA</i>	<i>IKZF1</i>	<i>PTEN</i>	<i>WT1</i>
<i>CSF3R</i>	<i>JAK2</i>	<i>PTPN11</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>CUX1</i>	<i>JAK3</i>	--	--

**Панель генов для определения соматических мутаций при остром
миелобластном лейкозе (141 ген)**

Название гена	Название гена	Название гена	Название гена	Название гена
<i>ASXL2</i>	<i>KLHDC8B</i>	<i>OR8B12</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>FAM154B</i>
<i>ABL1</i>	<i>KLHL6</i>	<i>P2RY2</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>FAM47A</i>
<i>ADA</i>	<i>KMT2A</i>	<i>PAX5</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>FAS</i>
<i>ANKRD26</i>	<i>KMT2C</i>	<i>PCDHB1</i>	<i>CEBPA</i>	<i>FBXW7</i>
<i>ASXL1</i>	<i>KRAS</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>CHEK2</i> (<i>RAD53</i>)	<i>FLRT2</i>
<i>ATM</i>	<i>LRRC4</i>	<i>PHF6</i>	<i>CREBBP</i>	<i>FLT3</i>
<i>ATRX</i>	<i>LUC7L2</i>	<i>PML</i>	<i>CRLF2</i>	<i>GATA1</i>
<i>BCL6</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PMS2</i>	<i>CSF1R</i>	<i>GATA2</i>
<i>BCOR</i>	<i>MLH1</i>	<i>PRAMEF2</i>	<i>CSF3R</i>	<i>GJB3</i>
<i>BCORL1</i>	<i>MPL</i>	<i>PRF1</i>	<i>CTCF</i>	<i>GNAS</i>
<i>BCR</i>	<i>MSH2</i>	<i>PRPF40B</i>	<i>CUX1</i>	<i>HNRNPK</i>
<i>BIRC3</i>	<i>MSH6</i>	<i>PRPF8</i>	<i>DAXX</i>	<i>HRAS</i>
<i>BLM</i>	<i>MYC</i>	<i>PTEN</i>	<i>DDX41</i>	<i>IDH1</i>
<i>BRAF</i>	<i>MYD88</i>	<i>PTPN11</i>	<i>DNM2</i>	<i>IDH2</i>
<i>BRCA1</i>	<i>NBN (NBS1)</i>	<i>RAD21</i>	<i>DNMT1</i>	<i>IKZF1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>NF1</i>	<i>RB1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>IKZF3</i>
<i>BRINP3</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>RELN</i>	<i>EED</i>	<i>IL7R</i>
<i>C17orf97</i>	<i>NPAT</i>	<i>RUNX1</i> (<i>AML1</i>)	<i>EGFR</i> (<i>ERBB1</i>)	<i>IL7R</i>
<i>CALR</i>	<i>NPM1</i>	<i>SETBP1</i>	<i>ELANE</i>	<i>JAK1</i>
<i>CARD11</i>	<i>NRAS</i>	<i>SF1</i>	<i>EP300</i>	<i>JAK2</i>
<i>CBL</i>	<i>NSD1</i>	<i>SF3A1</i>	<i>ETNK1</i>	<i>JAK3</i>
<i>CBLB</i>	<i>NTRK3</i>	<i>SF3B1</i>	<i>ETV6</i>	<i>KAT6A</i>
<i>CBLC</i>	<i>OR13H1</i>	<i>SH2B3</i>	<i>EZH2</i>	<i>KCNA4</i>
<i>WRN</i>	<i>WT1</i>	<i>XPO1</i>	<i>KCNK13</i>	<i>KDM6A</i>
<i>KDR (VEGFR3)</i>	<i>KIT (CD117)</i>	<i>SMC1A</i>	<i>SMC3</i>	<i>SRP72</i>
<i>SRSF2</i>	<i>STAG2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STXBP2</i>	<i>SUZ12</i>
<i>TAL1</i>	<i>TERC</i>	<i>TERT</i>	<i>TET2</i>	<i>TNFRSF13B</i>
<i>TP53 (p53)</i>	<i>TPMT</i>	<i>TUBA3C</i>	<i>U2AF2</i>	<i>WAS</i>

Примечание: панель покрывает все экзонные регионы и +/- 5-10 п.о. на границе экзон-интрон.