

УДК: **616.155.392-036.12-074:575.22**

Год издания: **2012**

## **Выявление точечной мутации T315I у пациентов с хроническим миелолейкозом методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов**

Яцук М.Н., Воропаев Е.В., Осипкина О.В., Баранов О.Ю.

**Рубрики:** 34.15.23, 76.29.33, 76.35.33

Гомельский государственный медицинский университет

**Тема НИР:** «Молекулярно-генетические механизмы формирования предрасположенности и особенностей течения заболеваний желудочно-кишечного тракта, репродуктивной, сердечно-сосудистой и кроветворной систем»

**Сроки выполнения НИР:** 01.01.2011г. — 31.12.2013 г.

**Научный руководитель:** канд. мед. наук Е.В. Воропаев

**Источник финансирования:** госбюджет.

*Цель:* подобрать оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) для выявления точечной мутации T315I у пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ).

Точечная мутация T315I (замена треонина на изолейцин) происходит в результате замены нуклеотида цитозина на тимин в 68721 положении гена ABL и вызывает развитие панрезистентности к препаратам группы ингибиторов тирозинкиназы. Данная мутация относится в группу наиболее часто встречаемых и может быть выявлена у пациентов с ХМЛ на всех стадиях заболевания. Наличие замены T315I эксперты Европейского общества по борьбе с лейкемией определили показанием к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Так как успешность исхода ТГСК во многом зависит от стадии заболевания на момент ее проведения и наилучшие результаты достигаются в хронической фазе, раннее определение мутантного клона является актуальным вопросом современной медицины.

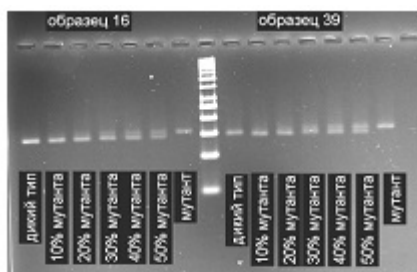
Основным методом выявления точечных мутаций является прямое секвенирование. К сожалению, чувствительность метода низкая (~20%), а его выполнение требует наличия специального дорогостоящего оборудования. Нами были подобраны условия проведения метода ПЦР-ПДРФ, который с незначительными временными затратами позволяет выявить мутацию T315I и может быть воспроизведен в любой ПЦР лаборатории.

Аmplification участка гена ABL проводили с помощью стандартной ПЦР. Последовательность праймеров F-ABL DNA, R-ABL DNA подбирали программой «Primer-BLAST» и синтезировали в компании «Праймтех» (Беларусь). ПЦР проводили при помощи реактивов фирмы «Fermentas» (Литва). Оптимальные условия проведения ПЦР определяли эмпирически. При подборе рестриктазы опирались на литературные данные, а также использовали программу Neb Cutter v.2.0. В исследования была включена рестриктаза TspRI (TscAI).

Для исследований использовали ДНК, полученную от пациентов с ХМЛ в различных фазах заболевания и от пациентов без гематологических заболеваний в анамнезе, не предъявляющих жалоб, указывающих на гематологическую патологию, и без изменений в общем анализе крови.

В качестве контрольных образцов использовали искусственно синтезированные ампликоны с мутантной и дикой нуклеотидной последовательностью. Синтез проводили самостоятельно при помощи ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя Sybr Green, нуклеотидную последовательность подтверждали методом прямого секвенирования. Из контрольных образцов готовили

серию разведений с долей мутантной нуклеотидной последовательности 10; 20; 30; 40 и 50%. В последующем образцы с различной концентрацией мутантного ампликона исследовали методом ПЦР-ПДФ с использованием рестриктазы TspRI (Tscal). На фореграмме ампликон с нуклеотидной последовательностью дикого типа отображен в виде зоны с молекулярной массой 159 п.н., а мутантного типа — 162 п.н. На рис. представлена фореграмма проведения ПЦР-ПДФ искусственно синтезированных контрольных мутантных образцов с различным разведением с использованием рестриктазы Tscal.



**Рис. Электрофоретическая детекция ПДФ-ПЦР искусственно синтезированных контрольных мутантных образцов с разным разведением использованием рестриктазы Tscal**

Таким образом, по предварительно полученным нами данным при использовании метода ПЦР-ПДФ предположить замену T315I в образце можно при наличии мутантной нуклеотидной последовательности в образце не менее 30%.

Данная методика может быть рекомендована для применения в организациях здравоохранения, проводящих диагностику и мониторинг терапии пациентов с ХМЛ молекулярными методами.