

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ
НЕК 293 ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИИ В ГЕНЕ JAK2 (V617F)
МЕТОДОМ ПЦР-РТ ООО НПФ ЛИТЕХ**

Ануфриева Е. Е., Суховольская М. А.

**Научный руководитель – канд. биол. наук, профессор Н. М. Титова,
канд. биол. наук, доцент Т.Н. Субботина, канд. мед. наук, доцент И. А.**

Сибирский федеральный университет

Миелопролиферативные заболевания представляют собой группу гематологических заболеваний, характеризующихся первичным расстройством кроветворных стволовых клеток, приводящим к росту одного или нескольких типов клеток крови. Для данных патологий характерно гиперклеточность костного мозга, повышение количества периферических эритроцитов, тромбоцитов, нейтрофилов. Заболевания могут осложняться тромбоэмболическими явлениями и кровотечениями. Выделяют несколько наиболее значимых заболеваний: полицитемия, тромбоцитемия, идиопатический миелофиброз и хронический миелолейкоз.

Наиболее важным критерием в диагностике миелопролиферативных заболеваний является мутация V617F в гене Jak2, который кодирует нерецепторную тирозинкиназу, участвующую в передаче сигнала от рецепторов цитокинов и факторов роста к ядру клетки и экспрессирован в ранних предшественниках гемопоэза. Данная мутация определяется в 90–95 % случаев истинной полицитемии, 50–70 % случаев эссенциальной тромбоцитемии и 40–50 % случаев миелофиброза.

Мутация V617F приводит к замене валина на фенилаланин в положении 617 и вызывает нарушение структуры тирозинкиназы, самоактивацию киназных доменов и появление высокой активности тирозинкиназы, что приводит к активации пролиферации клетки и блокаде процессов апоптоза.

Мутация является маркером, при помощи которого можно проводить первичную и дифференциальную диагностику данных заболеваний. Точность определения мутации требует систематического контроля аналитической воспроизводимости результатов. С этой целью в клинической лабораторной диагностике принято использовать контрольные материалы максимально приближенные по физико-химическим характеристикам к опытным образцам. Применительно к исследованию мутации JAK2(V617F) в клеточных суспензиях пациентов, в качестве такого контрольного материала лучше всего подходят клеточные линии опухолевых клеток, содержащие искомую мутацию. Однако, коммерческих контрольных клеточных материалов, содержащих заведомо известное количество измененных генов, в настоящее время нет. С целью поиска таких «стандартизированных» по данной мутации клеточных культур необходимо подобрать условия для исследования мутации JAK2(V617F) в клеточных суспензиях пациентов.

Для клеточных культур, характерно получение высокой концентрации ДНК при выделении набором ДНК-сорб-В по сравнению с концентрацией ДНК из лейкоцитов цельной крови, выделенной набором реагентов ДНК-экспресс кровь. Так же наблюдается высокая концентрация выделяемой ДНК из лейкоцитов цельной крови у пациентов с лейкозами и миелопролиферативными заболеваниями, которые характеризуются гиперклеточностью. Немногие производители наборов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени указывают количество ДНК, которое необходимо внести в реакционную смесь. Тем не менее, концентрация ДНК важна для

проведения ПЦР и получения достоверных результатов. При внесении в образец ДНК в высокой концентрации происходит эффективное связывание нуклеиновых кислот с флуоресцентным красителем, используемым для проявки накопления ДНК в ходе ПЦР, что ведет к повышению уровня фоновой флуоресценции. Иногда флуоресценция настолько высока, что соответствует предельной интенсивности регистрируемого прибором сигнала. При использовании же малой концентрации ДНК существенную роль начинает играть фактор случайного попадания в пробирку для ПЦР разного числа стартовых молекул. Такой фактор может приводить к возникновению разницы в количестве нуклеиновых кислот в пробах в несколько раз.

С целью поиска оптимальной концентрации ДНК в клеточных суспензиях для определения данной мутации мы провели исследование гена JAK2 в клетках НЕК 293. Клеточная культура НЕК 293 представляют собой клеточную линию, первоначально полученную из человеческих эмбриональных клеток почки и преобразованную путем инфицирования аденовирусом пятого серотипа. Данная линия широко используется в клеточной биологии. В литературе нам не встретилось информации о наличии мутации V617F в клетках данной клеточной линии. В качестве объекта исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из клеток клеточной культуры НЕК 293.

Осуществлялся подсчет клеток в камере Горяева и их разведение для получения конечной концентрации, соответствующей концентрации лейкоцитов цельной крови. Выделение ДНК из клеток проводилось, с использованием реагента «ДНК - сорб - В» (Интерлабсервис). Измерение концентрации ДНК производилось с использованием набора реагентов Quant-iT™ ssDNA Assay Kit для измерения концентрации ДНК с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen). Далее с образцами выделенной ДНК была проведена полимеразная цепная реакция с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс-РВ» (НПФ Литех) на амплификаторе iCycler iQ5 (BioRad).

При проведении ПЦР с образцами неразведенной ДНК, концентрация которых составила 23 нг/мкл, мутации V617F, не было обнаружено, но выход сигнала происходил на поздних циклах, по сравнению с положительным контролем – нормальной гомозиготой. Образцы ДНК развели в 10 раз ТЕ-буфером для получения концентрации 2,3 нг/мкл. Нами были получены ложные гетерозиготы, выход сигнала происходил так же на поздних циклах. В результате работы с высокими и низкими концентрациями ДНК нами были получены сомнительные результаты. После переговоров с разработчиками, нами была выяснена оптимальная концентрация ДНК для проведения ПЦР. Тем самым мы повлияли на то, чтобы информация об уровне вносимой ДНК официально входила в методическое пособие для проведения ПЦР.

Исходную концентрацию 23 нг/мкл вновь развели в 2,3 раза. Провели измерение концентрации ДНК на флуориметре Qubit и развели в 2,5 раза реагентом ДНК – экспресс кровь, предварительно прогрев его при 98⁰ С 15 минут. Данная процедура прогрева соответствует заключительному этапу выделения ДНК из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента ДНК – экспресс кровь и концентрация ДНК в образцах выделенных таким реагентом является оптимальной для постановки ПЦР с комплектом реагентов «SNP-экспресс-РВ». Конечная концентрация ДНК для проведения полимеразой цепной реакции составила 4 нг/мкл. В результате измерения было показано, что клетки не имеют искомой мутации, и выход сигнала происходил не на поздних циклах.

Таким образом, при тестировании проб на мутацию гена в ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени необходимо контролировать уровень вносимой ДНК. Так же существует необходимость указания в наборах нужной концентрации ДНК для оптимальной работы набора