

Резюме

В работе представлены результаты изучения поведения мышиных бластоцист при длительном культивировании в определенных условиях на слое митомицин С инактивированных мышиных фибробластов (MIF). Для поддержания плюрипотентного состояния ES-клеток в культуре в среду, добавляли LIF (лейкемия ингибирующий фактор). Цитохимическим окрашиванием по Гомори выявлена высокая активность щелочной фосфатазы в мышиных ES-клетках.

В роботі представлені результати вивчення поведінки бластоцисти миші при довготривалому культивуванні у визначених умовах на шарі інактивованих митомицином С фібробластів миші (MIF). Для підтримання плюрипотентного стану ES-клітин в середовище додавали LIF (лейкемія інгубуючий фактор). Цитохімічним забарвленням за Гоморі виявлена висока активність лужної фосфативи у ES-клітинах миші.

Results of the mouse blastocyst behaviour study during their long-time cultivation under definite conditions on the layer of mytomicin C — inactivated mouse fibroblasts (MIF) are presented in the article. To support pluripotent state of ES cells in culture, LIF (leukemia ingibitor factor) has been added to the medium. High alkaline phosphatase activity has been revealed in mouse ES cells by cytochemical Homori staining.

ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЕСЬВ Г.Д.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна
e-mail: m.v.dybkov@imb.org.ua*

ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЇ V617F В ГЕНІ *jak2* ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НЕОПЛАЗМИ ЗА ДОПОМОГОЮ T-ARMS ПЛР

Однією з головних відмінностей нової, четвертої ревізії класифікації та діагностичних критеріїв ВОЗ є використання при постановці діагнозів генетичних маркерів. Зокрема, згідно цього документу генетичні маркери мають використовуватись і при діагностиці мієлопроліферативних неоплазм [1] — гетерогенної групи неопластичних захворювань, які характеризуються множинною гіперплазією гемопоетичних клітин кісткового мозку. Згідно останньої ревізії до мієлопроліферативних неоплазм відносять: хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), хронічну нейтрофільну лейкемію, справжню поліцитемію, ідіопатичний мієлофіброз, есенціальну тромбо-цитемію, хронічну еозинофільну лейкемію, мастоцитоз та хронічні мієлопроліферативні захворювання, некласифіковані. Введенню генетичних маркерів у діагностичну практику при мієлопроліферативних неоплазмах передували кілька відкриттів. Відомо, що донедавна лише для ХМЛ було описано чіткий цитологічний маркер — філадельфійську хромосому, та відповідний молекулярний маркер — злитий ген *bcr/abl*. Але в 2005 році одночасно кілька груп

авторів [2–5] описали мутацію в чотирнадцятому екзоні гена *jak2*, що призводила до заміни валіну на фенілаланін у позиції 617. Мутація V617F виявляється у 95% хворих на справжню поліцитемію, приблизно і приблизно у 50% хворих на есенціальну тромбоцитемію та ідіопатичний мієлофіброз. І хоча функціональна роль цієї мутації не встановлена (вважають, що дана мутація в псевдокіназному домені призводить до порушення регуляції кіназної активності, що призводить до конститутивної активації тирозинкінази JAK2, і, відповідно, до збільшення кількості еритроцитів, тромбоцитів та гранулоцитів), однак висока частота даної мутації дозволила включити її як важливий діагностичний критерій. Так виявлення цієї мутації відноситься до головних критеріїв при встановленні діагнозів “справжня поліцитемія”, “ідіопатичний мієлофіброз” та “есенціальна тромбоцитемія” [1]. Також її наявність виключає вторинну поліцитемію, реактивний тромбоцитоз чи вторинний фіброз кісткового мозку тощо.

У дані роботі наводиться метод виявлення мутації V617F за допомогою tetra-primer amplification refractory mutation system ПЛР (T-ARMS ПЛР).

Матеріали і методи

У роботі використовували зразки крові хворих (за інформованої згоди), що проходили лікування в гематологічних клініках м. Києва. РНК виділяли згідно [6]. Зворотну транскрипцію проводили в об’ємі 30 мкл у суміші, що містила буфер для зворотної транскриптази, 1 мМ dNTP, 0,1 мкг праймера Random Hexamer Primer, 300 од зворотної транскриптази RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 20 од РНАзіну та 1–3 мкг РНК. Реакцію проводили при 42 °С протягом 1 год і зупиняли прогріванням при 70 °С 10 хв. Праймери підбирали за допомогою он-лайн утиліти http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об’ємі 30 мкл продовж 30 циклів (94 °С — 35 с, 60 °С — 40 с, 72 °С — 35 с) з використанням буферу для ПЛР (100 мМ трісОН 8,0 50 мМ KCl); 10 pmol праймерів J4-FO (GAAGAGAAGTAGGAGACTACGGTCAAC) та J4-RO (ATAAGCAGAATATT TTTGGCACATACAT); 30 pmol праймерів J4-FI (GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGT ATATG) та J4-RI (ACCAGAATAT TCTCGTCTCCACAAAA); 200 мМ dNTP та 2 мкл суміші для отримання кДНК. Продукти ампліфікації аналізували в 2% агарозному гелі.

Результати та обговорення

Існує кілька підходів до виявлення мутації V617F в гені *jak2* — це і ПЛР ампліфікація відповідного регіону з подальшим його секвенуванням чи рестрикційним аналізом, проведення кількісної ПЛР, тощо. Однак як було показано раніше [7] є доцільним використання саме ЗТ-ПЛР задля уніфікації початкових процедур виявлення генетичних маркерів, наприклад, для виявлення злитого гена *bcr/abl* [8], делецій в 12-му екзоні гена *jak2* тощо. Раніше нами було запропоновано тест-систему для виявлення мутації V617F за допомогою ПЛР та прямого секвенування ампліфікатів [7]. І хоча даний підхід має певні переваги, насамперед виявлення мінорних мутацій в даному регіоні даний аналіз вимагає значного часу і є коштовним. Тому для експрес тесту нами

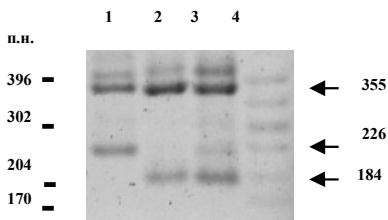


Рис. Електрофореграма продуктів Т-ARMS ПЛП, що були отримані при дослідженні крові:

1 — здорового донора (G-алель), 2 — хворого М (Т-алель), 3 — хворого П (G- та Т- алелі); 3 — маркер молекулярних мас рЕТ32а/HinfI. Праворуч стрілками показано відповідні алелі

пропонується метод виявлення мутації V617F за допомогою методу tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (T-ARMS-PCR), який базується на використанні двох зовнішніх геноспецифічних праймерів та двох алельспецифічних внутрішніх праймерів. В результаті проведення ПЛП із усіма чотирма праймерами напрацьовується повнорозмірний контрольний фрагмент та один чи два алельспецифічні фрагменти. Праймери підбирають так, щоб алельспецифічні фрагменти різнилися за розміром і їх можна було б виявити за допомогою простого електрофорезу в агарозному гелі. Так в нашому випадку розмір продукту для G-алеля (норма) складає 226 п.н., для Т-алеля (відповідає мутації V617F) — 184 п.н., контрольний геноспецифічний фрагмент — 355 п.н.

На рисунку представлено електрофореграму продуктів Т-ARMS ПЛП хворих П., 1950 року народження та М, 1942 р.н., (діагнози встановлені на підставі клініко-гематологічних досліджень) та здорового донора. Як видно з рисунку у всіх трьох зразках виявляється контрольний геноспецифічний алель. У здорового донора виявляється лише G-алель, у хворого П — Т-алель і у хворого М — обидва маркери (G- та Т-алелі). Тому можна стверджувати, що ген *jak2* гомозиготний за мутацією V617F у пацієнта П і гетерозиготний — у пацієнта М. Оскільки у обох хворих виявлено мутацію V617F, то діагноз, який був поставлений за клініко-гематологічними показниками підтверджується наявністю генетичних маркерів згідно чинних діагностичних критерії ВОЗ [1].

Таким чином, запропонована методика виявлення мутації V617F за допомогою Т-ARMS ПЛП може використовуватись для генетичної діагностики мієлопроліферативних неоплазм.

Література

1. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition.— 2008.— IARC.— 439 p.
2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // Lancet 2005.— V.365, N9464.— P. 1054–1061.

3. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // N. Engl J. Med 2005.— V.352, N17.— P. 1779–1790.

4. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // Cancer Cell 2005.— V.7, N4.— P. 387–397.

5. Zhao R., Xing S., Li Z., et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // J. Biol Chem. 2005.— V.280, N24.— P. 22788–22792.

6. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analyt. Biochem.— 1987.— V.162.— P. 156–159.

7. Дибков М.В., Гартовська І.Р., Телегеев Г.Д., Малюта С.С. Розробка тест-системи для виявлення мутації V617F гена *jak2* у хворих на хронічні мієлопроліферативні захворювання // Наука та інновації.— 2009.— Т.5, №6.— С. 59–63.

8. Телегеев Г.Д., Дибков М.В., Божко М.В. Демиденко Д.В., Малюта С.С., Третьяк Н.М., Бондар М.В. Моніторинг хронічного мієлолейкозу за допомогою молекулярно-біологічних методів (методичні рекомендації) // Республіканський центр науково-медичної інформації., Київ, 1997, 20 стор.

Резюме

Мутація V617F гена *jak2* є важливим діагностичним критерієм при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях. Запропоновано методику для її виявлення за допомогою T-ARMS ПЦР.

Мутація V617F гена *jak2* являється важним діагностичним критерієм при діагностиці хронічних мієлопроліферативних захворювань. Предложена методика ее выявления с помощью T-ARMS ПЦР.

V617F mutation *jak2* gene is an important diagnostic criterion for the diagnostics of chronic myeloproliferative disorders. The method of detection using T-ARMS PCR was proposed.

ЗЕЛЕНЬКИЙ С.Б.¹, БОБЫК В.И., МАНДРЫК С.Я., СИДОРИК Л.Л., ПОГРЕБНОЙ П.В.

¹ ИЕПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 45, e-mail: now15green@yahoo.com

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО, НИЗКОИММУНОГЕННОГО И ВЫСОКОКАТИОННОГО ПЕПТИДА *HVD-2*

Антимикробные пептиды (дефенсины) являются неотъемлемой частью так называемого неадаптивного, врожденного иммунитета. Все они действуют на широкий спектр микроорганизмов, грибов и вирусов, имеющих оболочку. Кроме того, исследования последних лет, показали, что что опухолям