

Мониторинг химеризма с помощью коротких tandemных повторов может осуществляться с учётом статтер-пиков ПЦР

Научный руководитель – Рисинская Наталья Владимировна

Кострица Наталья Сергеевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

E-mail: nataliakostritsa@gmail.com

Мониторинг химеризма - основной способ контроля процесса приживления трансплантата после аллогенной трансплантации костного мозга. Рутинный клинический метод - амплификация коротких tandemных повторов при помощи ПЦР (short tandem repeats, STR-ПЦР), базирующийся на различиях в длине STR в геномах донора и реципиента [1]. Подсчёт может быть осложнён тем, что часто при ПЦР образуются более короткие, чем основной продукт, продукты, которые могут совпадать со специфическими метками реципиента - статтер-пики [3].

В литературе рекомендуют использовать такие метки только в том случае, если высота пика, отражающего суммарное количество продукта специфической реципиентской метки и статтер-продукта, соизмерима со специфической меткой донора [2].

Целью исследования стало выявление зависимости вклада статтер-пика в общее количество ПЦР-продукта от локуса и выведение универсальных формул для расчёта химеризма с учётом этих пиков.

Методы Для STR-ПЦР геномной ДНК из костного мозга использовали COrDIS Plus - мультиплексный набор для амплификации 19 полиморфных STR-маркеров и локуса амелогенина человека. Фрагментный анализ проводили на анализаторе нуклеиновых кислот 3130 Genetic Analyzer. Обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения GeneMapper v.4-0. Информативные локусы были выбраны ранее путем сравнения ДНК пациента до трансплантации и ДНК донора. Химеризм рассчитывали с использованием стандартных формул [2].

Результаты На основе данных анализа 50 меток (18 гомо-, 15 гетерозигот и 17 гетерозигот, где второй статтер-пик совпадает с информативным пиком донора) (рис.1) было рассчитано, что вклад статтер-пика в общее количество продукта составляет от 1.2% до 11% и является локус-специфичным (с учётом количества информативных меток и статтер-пиков) при неизменяемом протоколе ПЦР (расчёты были проведены для 10 локусов ДНК от 11 пациентов). В каждом локусе стандартное отклонение оказалось не более 1.5% для каждого сочетания аллелей. Далее были выведены формулы для подсчёта химеризма с учётом вклада статтер-пиков (рис.1). Формулы протестированы на материале пациентов со смешанным химеризмом (контроль - информативные метки без статтер-пиков). Значения химеризма, вычисленные по контрольным меткам и тестируемыми с учетом вклада статтеров совпали.

Заключение При необходимости для расчёта химеризма можно использовать информативные маркёры, совпадающие со статтер-пиками, для корректных вычислений используя приведённые выше формулы.

Источники и литература

- 1) Блау О. В. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Клиническая онкогематология 2013, 6(1): 34-39

- 2) 2. Nollet F, Billiet J, Selleslag D, Criel A: Standardization of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. Bone Marrow Transplant 2001, 28:511–8
- 3) 3. Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. Nucleic Acids Res. 1996 Jul 15;24(14):2807-12

Иллюстрации

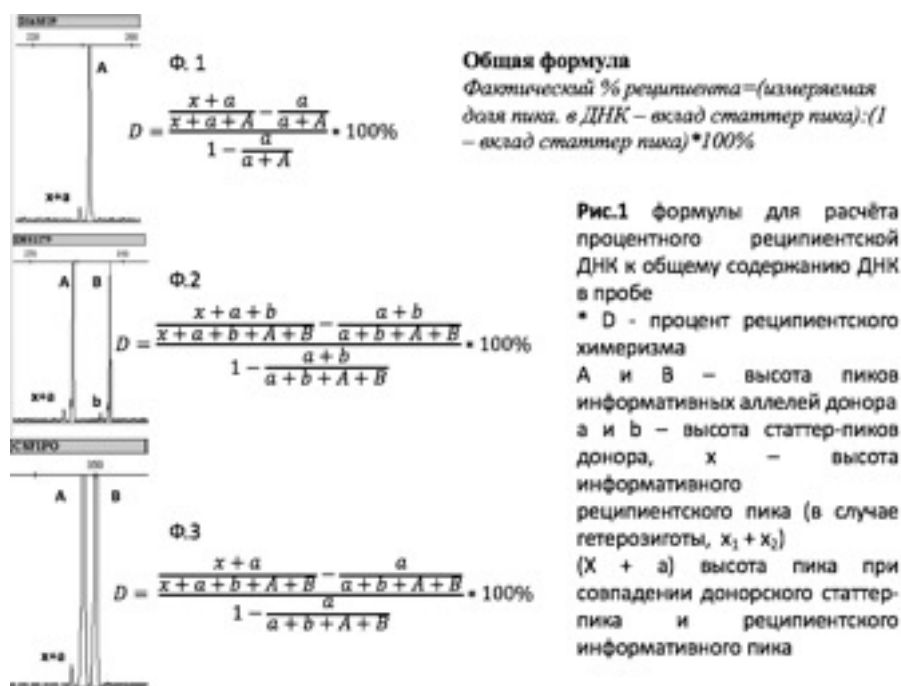


Рис. 1. Рис. 1 Формулы для вычисления химеризма с учётом статтер-пиков для разных сочетаний аллелей