

УДК 616.5-006.04-07:577.21.08

## РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛОНАЛЬНОСТИ ПО ГЕНАМ БЕТА ЦЕПИ Т-КЛЕТОЧНОГО ЦЕНТРА

Ковалевич А. А. (Университет ИТМО), Сидорова Ю. В. (ФГБУ «НМИЦ гематологии»)

Алексеев Я. И. (ООО «НПФ Синтол»)

Научный руководитель – кандидат биологических наук, Алексеев Я. И.  
(ООО «НПФ Синтол»)

**Введение.** Т-лимфоциты выполняют несколько важных функций в иммунном реагировании. Они осуществляют специфическое распознавание и уничтожение чужеродных клеток, а также регулируют иммунный ответ. Распознавание чужеродных клеток осуществляется антигенраспознающими Т-клеточными рецепторами (ТКР, TCR). ТКР - гетеродимер, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, которые ковалентно связаны между собой цистеиновыми мостиками и кодируются определенными генными сегментами. TCR $\alpha$ -цепь кодируется V- и J-генными сегментами,  $\beta$ -цепь имеет полный набор V-, D-, J-генных сегментов [1]. При созревании Т-лимфоцита в норме реаранжировки происходят последовательно, начиная с TCRD, TCRG, затем неполные реаранжировки TCRB (D $\beta$  – J $\beta$ ) и полные реаранжировки TCRB (V $\beta$  – J $\beta$ )[2]. Этот процесс рекомбинации в сочетании с неплановым добавлением или удалением нуклеотидов между сплайсированными генными сегментами создает репертуар TCR с теоретическим разнообразием приблизительно  $2 \times 10^{19}$  уникальных TCR $\alpha\beta$  [3]. Исследование моноклональности Т-лимфоцитов, к которому может привести выраженное иммунное реагирование или появление клона Т-клеток при опухолевом процессе, в нашей работе проводится на  $\beta$ -цепи. Для оценки Т-клеточной клональности по генам TCRB опирались на протокол BIOMED-2.

**Основная часть.** Анализ проводился с образцами 20 больных с Т-клеточной лимфомой, которые наблюдались в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России. Данная работа включает в себя подбор нужных компонентов и их количества для правильного определения клональности методами ПЦР и фрагментного анализа.

В методах мультиплексной ПЦР используется набор прямых праймеров, комплементарных всем известным V-генам, и набор обратных праймеров для J- или C-областей. Анализ клональности гена TCRB производился на приборах QuantStudio 5 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) и Нанофор 05 (Институт аналитического приборостроения, Россия). Мультиплексную амплификацию для TCRB проводили в трех пробирках: Tube A, Tube B, Tube C [4] с использованием праймеров производства Синтол, Россия. Пробирка А содержала прямые праймеры V $\beta$ 2 – V $\beta$ 24, а также обратные J $\beta$ 1.1 – J $\beta$ 1.6HEX, J $\beta$ 2.2, J $\beta$ 2.6, J $\beta$ 2.7FAM; пробирка В содержала V $\beta$ 2 – V $\beta$ 24, а также J $\beta$ 2.1, J $\beta$ 2.3 – J $\beta$ 2.5FAM; пробирка С содержала прямые праймеры: D $\beta$ 1 и D $\beta$ 2, и обратные: J $\beta$ 1.1 – J $\beta$ 1.6HEX, J $\beta$ 2.1 – J $\beta$ 2.7FAM.

Для приготовления смеси ПЦР были подобраны необходимое количество реагентов (производства Синтол, Россия): 1. 3 мкл праймера (10 pmol); 2. 10x буфер – 2 мкл; 3. Mg<sup>2+</sup> - 1.5 мкл (1,5 mM); 4. dNTP – 2 мкл (200  $\mu$ M); 5. Taq-полимераза – 0.3 мкл (2,5 U); 6. dH<sub>2</sub>O – 10 мкл; ДНК (100 нг) – 1 мкл. ПЦР проводилась на приборе QuantStudio 5 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) и состояла из денатурации 95°C в течение 7 минут, затем 35 циклов 95°C в течение 45 секунд, 60°C в течение 40 секунд и 72°C в течение 90 секунд, и окончательная элонгация при 72°C в течение 10 минут.

Для фрагментного анализа ампликон (2 мкл) разводили в 25 раз для пробирок А и В, для пробирки С в 30 раз и смешивали с 18 мкл смеси формамида Seq-DI™ (NimaGen B.V.) и маркером молекулярного веса «СД-450» (Sy-660, оранжевый). Конечную смесь нагревали до 95°C в течение 5 минут и охлаждали до 4°C в течение 2 минут. После охлаждения полученную смесь переносили в 96-луночный планшет и проводили фрагментный анализ на приборе Нанофор 05. Для этого использовали полимер для секвенирования и фрагментного анализа

ДНК «ПДМА-6» (линейный, N, N-полидиметилакриламид, 7М мочевины), спектральные калибраторы «СК-5» для 5 красителей (Sy-660, ROX, TAMRA, R6G и FAM), линейка капилляров длиной 36 см.

**Выводы.** Результатом работы является прототип набора реактивов и методика, позволяющие устанавливать поликлональный и моноклональный (с моноаллельными / биаллельными реаранжировками) результат исследования Т-клеточной клональности. Однако всё ещё остается проблема ложноположительных результатов при проведении анализа над решением которой продолжается работа.

**Список использованных источников:**

1. Chiffelle J. et al. T-cell repertoire analysis and metrics of diversity and clonality // *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 65. P. 284–295.
2. Сидорова Ю. В. И др. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ Клональные реаранжировки и опухолевые клоны при периферической Т-клеточной лимфоме. № 26. 2015 г.
3. Pai J.A., Satpathy A.T. High-throughput and single-cell T cell receptor sequencing technologies // *Nature Methods*. Nature Research, 2021. Vol. 18, № 8. P. 881–892.
4. van Dongen J.J.M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936 // *Leukemia*. 2003. Vol. 17, № 12. P. 2257–2317.