



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81257** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 15098	(72) Винахідник(и): Коваль Стелла Володимирівна (UA), Завелевич Михайло Петрович (UA), Дибков Михайло Васильович (UA), Телегсєв Геннадій Дмитрович (UA), Поліщук Лев Олександрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 28.12.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.06.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2013, Бюл.№ 12	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA), ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Ак. Заболотного, 150, м. Київ, 03143 (UA)

(54) СПОСІБ Виявлення мутації V617F гена JAK2 за допомогою алельспецифічних ПРАЙМЕРІВ**(57) Реферат:**

Спосіб виявлення мутації V617F гена jak2 за допомогою алельспецифічних праймерів у хворих з мієлопроліферативними новоутвореннями, причому для тетрапраймерної алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції застосовуються алельспецифічні праймери до ділянки гена jak2 в районі, відповідному 617 амінокислотному залишку білка Jak2, що дозволяє за допомогою звичайної техніки полімеразної ланцюгової реакції за розміром ампліфікатів виявляти амінокислотну заміну V617F.

UA 81257 U

Галузь техніки, до якої належить корисна модель: медицина, а саме: молекулярна діагностика онкогематологічних захворювань.

Рівень техніки. Однією з головних відмінностей нової четвертої ревізії класифікації та діагностичних критеріїв ВООЗ є використання при постановці діагнозів генетичних маркерів. Зокрема генетичні маркери мають використовуватись при діагностиці мієлопроліферативних новоутворень - гетерогенної групи неопластичних захворювань, які характеризуються множинною гіперплазією гемопоетичних клітин кісткового мозку [1]. Одним з цих маркерів є мутація в гені *jak2*, що призводить до заміни валіну на фенілаланін у позиції 617 (V617F). Мутація V617F виявляється у 95 % хворих на справжню поліцитемію і майже у 50 % хворих на есенціальну тромбоцитемію та ідіопатичний мієлофіброз [2-4]. Тому виявлення цієї мутації належить 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.

На сьогодні дану мутацію виявляють кількома методами: з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та секвенуванням отриманих продуктів [4], а також кількісною ПЛР [3]. Однак недоліком першого підходу є те, що дослідження потребує значного часу. Зокрема, результат дослідження може бути отриманий не раніше, ніж за дві доби. Другий підхід вимагає більш дорогого обладнання, яке не завжди є в наявності в звичайних діагностичних лабораторіях.

Тому доцільним було б використання методу ПЛР з праймерами, який дозволяє виявляти мутацію V617F гена *jak2* з використанням обладнання для проведення якісної (звичайної) ПЛР реакції.

Власне опис корисної моделі, що заявляється. В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу розробити спосіб виявлення мутації V617F на базі ПЛР з алельспецифічними праймерами для диференційної діагностики мієлопроліферативних новоутворень.

Поставлена задача вирішується тим, що для постановки реакції ПЛР підбираються алельспецифічні праймери до ділянки гена *jak2* в районі, який відповідає 617 амінокислотному залишку білка Jak2. З цими праймерами проводять реакцію тетрапраймерної алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції з візуалізацією отриманих ампліфікатів за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. В результаті за допомогою звичайної ПЛР з зазначеними праймерами можна за розміром ампліфікатів виявляти амінокислотну заміну V617F (амінокислота валін замінюється на фенілаланін), а саме ця заміна є одним із діагностичних критеріїв хронічних мієлопроліферативних новоутворень у людини згідно чинних діагностичних критеріїв ВООЗ. Час визначення складає 3 години.

Опис способу, що заявляється, стосовно застосування:

Для виявлення мутації V617F проводять виділення РНК з периферичної крові хворих з мієлопроліферативними новоутвореннями, отримують кДНК та проводять алельспецифічну ПЛР зі специфічними праймерами в об'ємі 30 мкл продовж 40 циклів (94 °C-35 с, 60 °C-40 с, 72 °C-35 с.) з використанням буферу для ПЛР (100 мМ трісОН 8,0 50 мМ KCl); 10 pmol

праймера J4-FO 5'-GAAGAGAAGTAGGAGACTACGGTCAAC; 10 pmol

праймера J4-RO 5'-ATAAGCAGAATATTTTTGGCACATACAT; 30 pmol

праймера J4-FI 5'-GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG; 30 pmol

праймера J4-RI 5'-ACCAGAATATCTCTCGTCTCCACAAAA; 200мкМ dNTP

та 2 мкл суміші для отримання кДНК. Ампліфікати аналізують в 2 % агарозному гелі за загальноприйнятими методиками. На електрофореграмі можуть виявлятися такі ампліфікати: контрольний геноспецифічний фрагмент (позитивний контроль) розміром 355 п.н., продукт, що відповідає G алелю (норма) 226 п.н., та продукт, що відповідає T алелю (мутація V617F) - 184 п.н. Таким чином, виявлення ампліфікату 184 п.н. буде свідчити про наявність мутації V617F гена *jak2*, що буде мати діагностичне значення.

Приклади практичного застосування корисної моделі

Результати молекулярно-генетичної діагностики зразків периферичної крові хворих з мієлопроліферативними новоутвореннями наведено в прикладах, які ілюструють можливості заявленої корисної моделі. Приклад 1.

Хворий П., 1950 року народження, за клініко-гематологічними проявами підозра на справжню поліцитемію.

Молекулярно-генетичне дослідження: Виділено РНК зі зразка периферійної крові, отримано кДНК та проведено алельспецифічну ПЛР із алельспецифічними праймерами. При розділенні продуктів ПЛР в агарозому гелі виявлено фрагменти розміром 355 та 184 п.н.

Висновок: Виявлено мутацію V617F гена *jak2* в гомозиготному стані.

5 Підтверджено діагноз справжньої поліцитемії, згідно з чинними діагностичними критеріями ВООЗ.

Приклад 2.

М., 1942 року народження, за клініко-гематологічними проявами підозра на есенціальну тромбоцитемію.

10 Молекулярно-генетичне дослідження: виділено РНК зі зразка периферійної крові, отримано кДНК та проведено алельспецифічну ПЛР із алельспецифічними праймерами. При розділенні продуктів ПЛР в агарозому гелі виявлено фрагменти розміром 355, 226 та 184 п.н.

Висновок: виявлено мутацію V617F гена *jak2* в гетерозиготному стані. Підтверджено діагноз есенціальної тромбоцитемії, згідно з чинними діагностичними критеріями ВООЗ.

15 Таким чином, заявлена корисна модель дозволяє проводити виявлення мутації V617F у хворих з мієлопроліферативними новоутвореннями згідно чинних молекулярно-генетичних діагностичних критеріїв ВООЗ.

Джерела інформації:

20 1. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, eds. Lyon: IARC Press 2008.-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. - №9464. - P. 1054-1061.

25 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. - № 17. - 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. - № 4. - P. 387-397.

30 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення мутації V617F гена *jak2* за допомогою алельспецифічних праймерів у хворих з мієлопроліферативними новоутвореннями, який **відрізняється** тим, що для тетрапраймерної алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції застосовуються алельспецифічні праймери до ділянки гена *jak2* в районі, відповідному 617 амінокислотному залишку білка Jak2, що дозволяє за допомогою звичайної техніки полімеразної ланцюгової реакції за розміром ампліфікатів виявляти амінокислотну заміну V617F.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601