

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

30.09.2011 г.

Регистрационный № 064-0611

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МУТАЦИЙ  
В ОНКОГЕНЕ BRCA1 (300T>G, 5382INSC) У ПАЦИЕНТОВ  
С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКОМ ЯИЧНИКА МЕТОДОМ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УЗ «Гродненская областная клиническая больница»,

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Курстак И.А., канд. биол. наук Кузнецов О.Е.,

д-р мед. наук, проф. Ляликов С.А.,

канд. мед. наук, доц. Савицкий С.Э., канд. биол. наук, доц. Воробьев В.В.

Гродно 2011

Инструкция разработана с целью определения мутаций 300T>G и 5382insC (5 и 20 экзон) гена BRCA1 у пациентов с раком молочной железы, раком яичника, а также у лиц, с наследственной предрасположенностью к опухолям данной локализации.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

Стандартное оборудование лаборатории полимеразой цепной реакции (амплификатор-термоциклер, камера для электрофореза, трансиллюминатор, бокс 2-го класса защиты (ламинарный шкаф), облучатели бактерицидные, холодильник, термостат, ультрацентрифуга, вортекс, комплект автоматических дозаторов, наконечники 50-1000 мкл РНК/ДНК освобожденные с бактериальным фильтром, пробирки 0,5-1,5 мл типа «Эппендорф», халаты лабораторные, перчатки одноразовые, реагенты для выделения ДНК и постановки полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) (смесь dNTP, Taq - полимеразы, Ferments *Eco47I* (*AvaII*), Agaroze, ПЦР - буфер, маркер DNA Ladder, праймеры, дезинфектант, дистиллированная вода).

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Рак молочной железы, рак яичников, наследственная предрасположенность к раку молочной железы, наследственная предрасположенность к раку яичников.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Не выявлены.

## **ОПИСАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ BRCA1 У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Геномную ДНК из образцов крови выделяют с использованием наборов реагентов в асептических условиях по общепринятой методике.

Перечень необходимых реагентов:

1. Смесь dNTP, Fermentas.
2. Taq – полимеразы, Fermentas.
3. Ferments *Eco47I* (*AvaII*).
4. Agaroze, Fermentas.
5. ПЦР – буфер, Bio-Rad.
6. Маркер DNA Ladder, Fermentas.
7. Праймеры.
8. Дезинфектант.
9. Дистиллированная вода.

Перечень необходимых праймеров для определения мутаций:

| <b>Праймер</b>          | <b>Мутация</b> | <b>Определяемый экзон</b> |
|-------------------------|----------------|---------------------------|
| 1. ATATGACGTGTCTGCTCCAC | 5382insC       | Exon 20 – f               |

|    |                      |          |             |
|----|----------------------|----------|-------------|
| 2. | CCTTTCTGTCCTGGGGATT  | 5382insC | Exon 20 – r |
| 3. | CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG | 300T>G   | Exon 5 – f  |
| 4. | TTCCTACTGTGGTTGCTTCC | 300T>G   | Exon 5 – r  |

Технология постановки реакции ПЦР с целью обнаружения мутаций гена BRCA:

|   |                                      |           |
|---|--------------------------------------|-----------|
| – | тестируемое ДНК – 2 мкл (100-200 нг) |           |
| – | ПЦР смесь (для 10 реакций):          |           |
|   | 10x Taq полимераза буфер             | 25,0 мкл  |
|   | 25 mM MgCl <sub>2</sub>              | 15,0 мкл  |
|   | 10 mM dNTP                           | 2,5 мкл   |
|   | праймер 1                            | 10,0 мкл  |
|   | праймер 2                            | 10,0 мкл  |
|   | праймер 3                            | 10,0 мкл  |
|   | праймер 4                            | 10,0 мкл  |
|   | Taq-полимераза                       | 0,6 мкл   |
|   | дистиллированная вода                | 146,9 мкл |

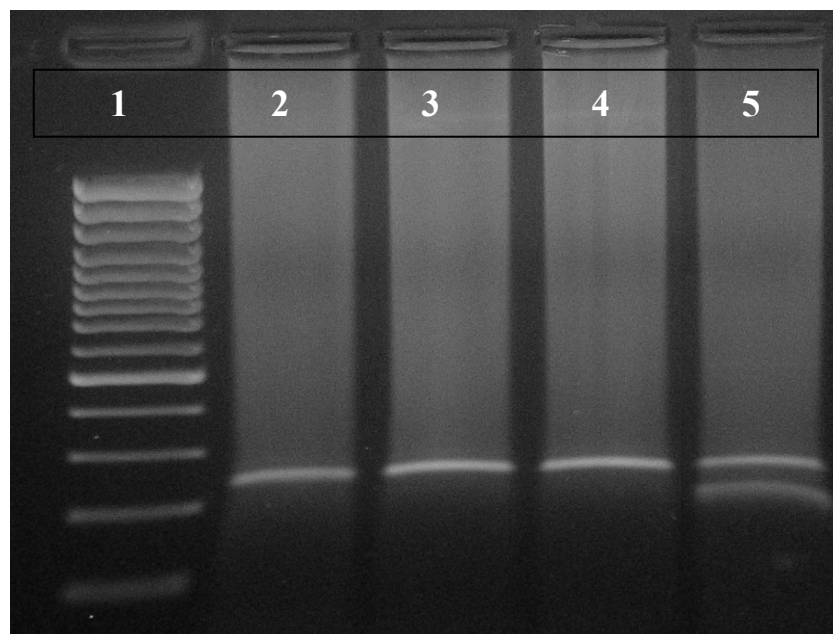
Приготовление рабочего реагента: к 2 мкл тестируемого ДНК добавляют 23 мкл ПЦР смеси.

Программирование термоциклера и проведение амплификации:

|      |        |   |           |
|------|--------|---|-----------|
| 94°C | 10 мин | } | 10 циклов |
| 94°C | 25 с   |   |           |
| 67°C | 25 с   |   |           |
| 72°C | 35 с   |   |           |
| 94°C | 25 с   | } | 35 циклов |
| 55°C | 40 с   |   |           |
| 72°C | 40 с   |   |           |
| 72°C | 7 мин  |   |           |
| 4°C  |        |   |           |

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации производят на агарозном геле – 12,5 мкл продукта, 120 В - 40 мин.

Продукты амплификации на агарозном геле детектируют при помощи трансиллюминатора (рис. 1).



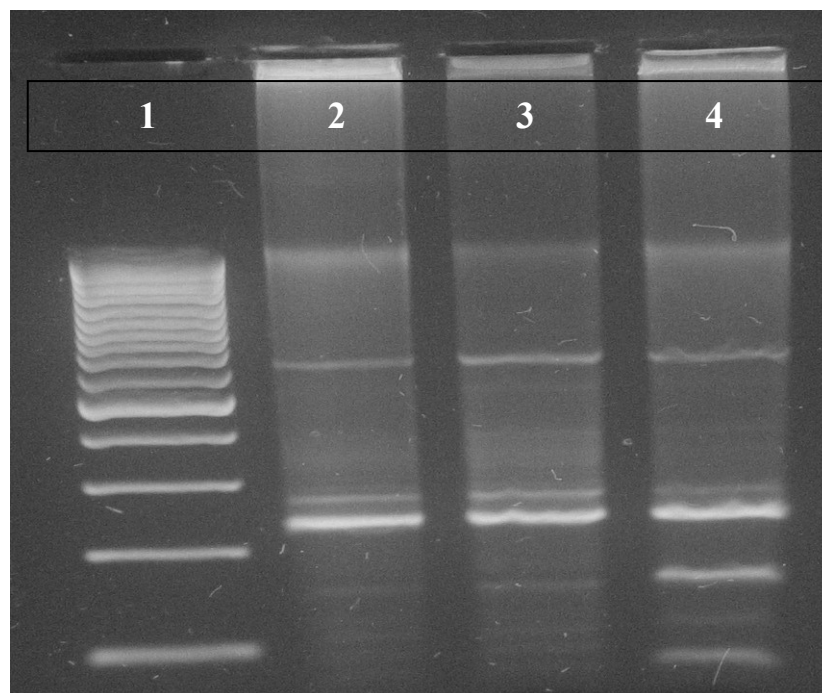
**Рис. 1. Амплификация продуктов на агарозном геле:**  
 1 – маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder;  
 2 – 4 исследуемое ДНК без мутации;  
 5 – обнаружена мутация 5382insC.

Рестрикция мутаций: 8 мкл продукта амплификации мутации 300T>G:  
 Рестрикционная смесь (на 10 исследований):

- буфер 20 мкл
- Ferments *Eco47I* (*AvaII*) 5 мкл
- дистиллированная вода 55 мкл

8 мкл продукта амплификации и рестрикционную смесь инкубируют при 37°C 12 – 20 часов, затем проводят электрофоретическое разделение продуктов амплификации на агарозном геле по общепринятой методике – 12,5 мкл продукта, 120V 40 мин.

Продукты амплификации на агарозном геле детектируют при помощи трансиллюминатора (рис. 2).



**Рис. 2. Амплификация/рестрикция и анализ мутации 300T>G:**  
1 – маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder;  
2 и 3 – исследуемое ДНК без мутации;  
4 – обнаружена мутация 300T>G.

### **ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ**

Ошибочные результаты при определении мутаций в гене BRCA1 могут быть получены при:

- использовании реагентов с истекшим сроком годности;
- неточном дозировании реагентов;
- неправильных условиях хранения биологического материала;
- несоблюдении времени и температуры амплификации.