

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л.Пиневич
2018 г.
Регистрационный № 249-1218

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МУТАЦИЙ 5382insC и 4153delA ГЕНА BRCA1
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Е.Л.Савоневич, к.б.н. Т.Л.Степура, к.м.н., доцент А.В.Шульга

Гродно, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод выявления мутаций 5382insC и 4153delA гена BRCA1, как маркеров наследственной предрасположенности к развитию злокачественных новообразований, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику и лечение рака яичников и молочной железы.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, врачей акушеров-гинекологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь женщинам.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Амплификатор с возможностью регистрации результата в режиме реального времени.
2. Твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа эппендорф.
3. Микроцентрифуги-вортексы.
4. Высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл до 12-13 тыс. об/мин.
5. Колба-ловушка.
6. ПЦР-бокс с УФ-лампой.
7. Комплект пипеточных дозаторов переменного объема (0,1-2; 2-20; 20-200; 100-1000 мкл).
8. Халат и одноразовые резиновые перчатки, сменная обувь.
9. Одноразовые микроцентрифужные пробирки с крышками объемом 1,5 мл.
10. Одноразовые ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл.
11. Штативы для микропробирок и наконечников.
12. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток переменного объема до 2, 20, 200, 1000 мкл.
13. Одноразовые наконечники до 200 мкл.

14. Холодильник с рабочей температурой $6\pm 2^{\circ}\text{C}$, морозильная камера.
15. Емкости с дезинфицирующим раствором.
16. Набор реактивов для экстракции нуклеиновых кислот из лейкоцитов венозной крови.
17. Реактивы для постановки реакции амплификации.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

C56 Злокачественное новообразование яичников

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Нет

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

А. Определение контингента для обязательного генетического тестирования.

Осуществляется среди пациенток с раком яичников после хирургического лечения по результатам патоморфологического исследования операционного материала. Обследованию подлежат женщины с определенными гистологическими типами злокачественных новообразований яичников эпителиального генеза (серозная/ тубулярная/ светлоклеточная/ недифференцированная карцинома G2-4).

Б. Выявление полиморфных маркеров в гене BRCA1.

Предлагаемый способ выявления полиморфных маркеров гена BRCA1 основан на аллель-специфической полимеразной цепной реакции с применением интеркалирующего красителя, результаты которой регистрируются в реальном времени. Данный метод основан на способности к нековалентному связыванию флуоресцирующих соединений с ДНК, приводящему к значительному усилению флуоресценции. В настоящей методике для этой цели применяется краситель SYBR Green с длиной волны испускания 520 нм, флуоресценция которого возрастает пропорционально

количеству двухцепочечных участков ДНК, образующихся на этапе отжига праймера и элонгации – образования ампликона.

1. Выделение ДНК. Для проведения исследования в вакутайнер, содержащий в качестве антикоагулянта ЭДТА, производят забор венозной крови. Непосредственно после взятия крови пробирки, закрытые крышками, перемешивают переворачиванием не менее 5 раз. Перемешивание должно осуществляться плавными движениями без встряхивания и пенообразования. Собранная вышеописанным способом венозная кровь доставляется в лабораторию в течение не более 2-х ч (при температуре 4-20°C).

Экстракция ДНК из полученных образцов осуществляется согласно методике производителя наборов для выделения ДНК из цельной крови. Хранение выделенных пробы ДНК допускается при температуре от +2 до +8°C не более 1 недели. Для более длительного хранения полученный раствор ДНК необходимо разделить на аликвоты и сохранять при температуре -20°C, избегая их многократного размораживания.

2. Постановка реакции амплификации. Непосредственно перед постановкой реакции амплификации все необходимые компоненты, кроме Taq ДНК-полимеразы, размораживают при комнатной температуре, тщательно перемешивают на вортексе и осаждают кратковременным центрифугированием на микроцентрифуге. Для каждого образца ДНК готовят две пробирки, предназначенные для выявления дикой и мутантной аллели. Одновременно в постановку включается отрицательный образец, не содержащий ДНК, который позволяет контролировать чистоту реагентов и образование гетеродимеров праймеров. В каждую пробирку вносят до 50 нг ДНК.

Для генотипирования полиморфных аллелей гена BRCA1 готовится реакционная смесь объемом 20 мкл на пробу, которая содержит следующие компоненты: 10 мкл 2-кратного ПЦР-буфера, 250 мкМ дЦТФ, 250 мкМ дТТФ, 250 мкМ дГТФ, 250 мкМ дАТФ, 1,5 ЕД Taq-полимеразы, 2 мМ MgCl₂, 2 мкМ каждого олигонуклеотида, 0,2 мкл SYBR Green.

Для обнаружения указанных полиморфных маркеров применяли праймеры (олигонуклеотиды), изготовленные промышленным способом.

Таблица – Последовательность олигонуклеотидов для постановки реакции амплификации при выявлении полиморфных маркеров гена BRCA1

Полиморфный маркер гена BRCA1	Последовательность олигонуклеотида	Т отжига, °С
5382 ins C	Аллель дикий: 5'- AAGCGAGCAAGAGAATTCCAG- 3' Аллель мутантный: 5'-AGCGAGCAAGAGAATTCCCA - 3' Общий: 5'-AGAACCTGTGTGAAAGTATCTAGCACTG - 3'	65
4153 del A	Аллель дикий: 5'- AGCCCGTTCCTCTTTCTTC- 3' Аллель мутантный: 5'- AGCCCGTTCCTCTTTCTTCA- 3' Общий: 5'-GACTGCAAATACAAACACCCA- 3'	62

Программа амплификации состоит из следующих этапов: начальная денатурация 95°C в течение 10 мин, 45 циклов амплификации, включающие этап денатурации ДНК при 95°C – 10 с, отжига праймера 65°C – 20 с, элонгации синтеза 72°C – 30 с.

3. Интерпретация результата реакции амплификации

В каждом цикле амплификации автоматически осуществляется регистрация интенсивности флуоресценции интеркалирующего красителя, отражающая наработку целевых продуктов амплификации. На основании полученных данных происходит автоматическое построение кривых накопления флуоресцентного сигнала в зависимости от цикла амплификации по

двум аллелям каждого образца. При анализе результата используется значение порогового уровня флуоресценции равное 10% от максимального значения. При значении критического уровня амплификации (Ct) более 30 результат учитывается как отрицательный. В случае гетерозиготной формы полиморфного варианта гена разность между циклами амплификации обоих аллелей (ΔC_t) не превышает 1,5 циклов (рисунок 1). В то время как при гомозиготном генотипе показатель ΔC_t составляет более 1,5 циклов (рисунок 2). Отрицательный контрольный образец характеризуется высокими значениями C_t (более 30) или низким уровнем флуоресценции сигнала в обоих аллелях.

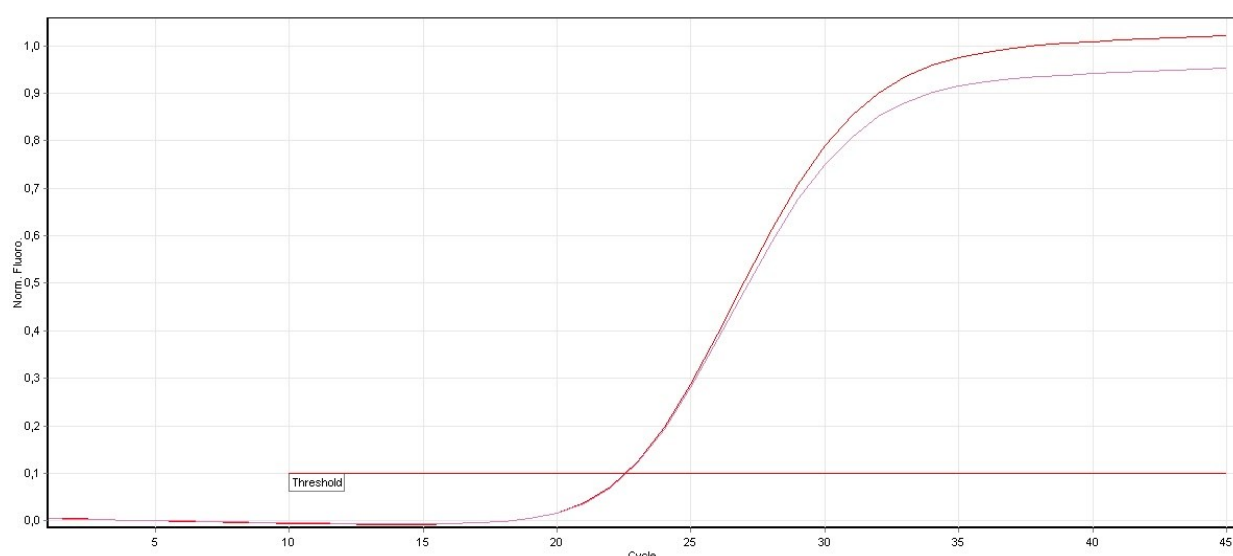


Рисунок 1 – Пример кривых амплификации при наличии мутантной аллели в гене BRCA1 (гетерозиготный генотип)

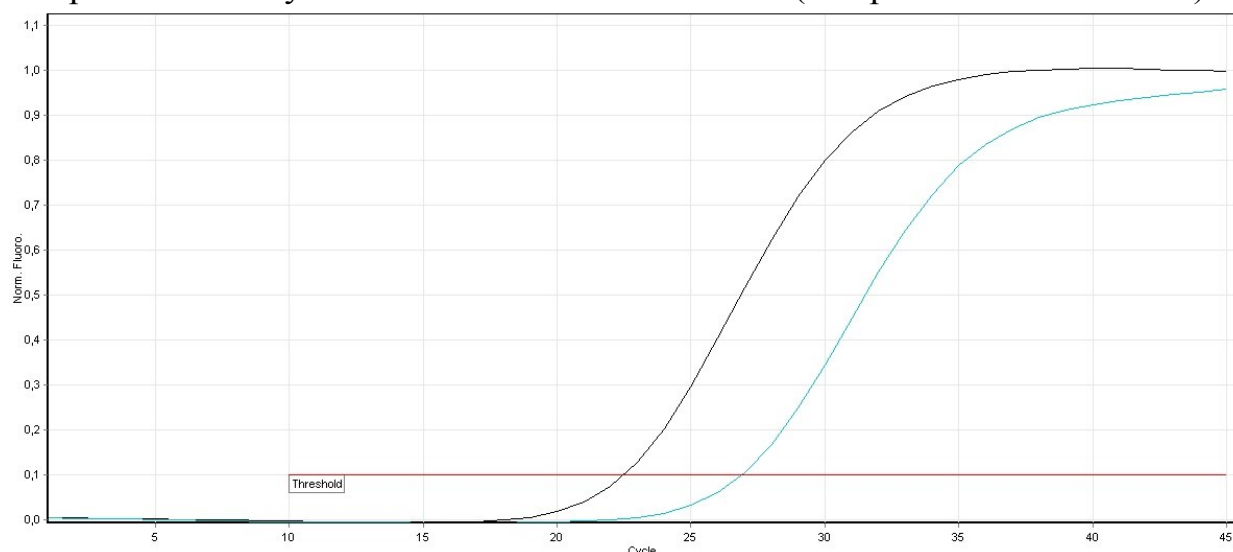


Рисунок 2 – Пример кривых амплификации при отсутствии мутантной аллели в гене BRCA1 (гомозиготный генотип)

При выполнении всех этапов полимеразной цепной реакции с детекцией результата в режиме реального времени необходимо соблюдение основных требований, изложенных в инструкции по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.11.2008 № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Во избежание диагностических ошибок рекомендуется соблюдать правила работы в молекулярно-генетической лаборатории, изложенные в инструкции по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.11.2008 № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

_____	УТВЕРЖДАЮ	_____
название	Главный врач	
_____		_____
учреждения		И.О.Фамилия
_____	_____201____	
здравоохранения	МП	

А К Т

учета практического использования инструкции по применению

1. Инструкция по применению: «Метод определения мутаций 5382insC и 4153delA гена BRCA1».

2. Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 28.12.2018 № 249 -1218.

3. Кем предложена разработка: доцентом кафедры акушерства и гинекологии Е.Л.Савоневич, научным сотрудником НИЧ НИЛ Т.Л.Степура, доцентом кафедры патологической анатомии А.В. Шульгой УО «Гродненский государственный медицинский университет»

4. Материалы инструкции использованы для _____

5. Где внедрено: _____

подразделение и название учреждения здравоохранения

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____
общее кол-во наблюдений « ____ »
положительные « ____ »
отрицательные « ____ »

7. Эффективность внедрения (восстановление трудоспособности, снижение заболеваемости, рациональное использование коечного фонда, врачебных кадров и медицинской техники) _____

8. Замечания, предложения: _____

_____201____ Ответственные за внедрение

Должность

подпись

И.О.Фамилия

Примечание: акт о внедрении направлять по адресу:
кафедра акушерства и гинекологии
УО «Гродненский государственный медицинский университет»
ул.Горького, 80
230009, г.Гродно