

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

24.06.2011 г.

Регистрационный № 259-1210

МЕТОДИКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВЕРИФИКАЦИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ МЕДУЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Е.Д. Черствый, канд. мед. наук П.Г. Киселев,
канд. мед. наук В.Е.Папок, С.И. Марчук

Минск 2010

Инструкция разработана с целью улучшения клинической диагностики наследственных форм медуллярного рака щитовидной железы путем молекулярно-генетической идентификации мутаций гена *ret*, характерных для данных форм опухоли.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Медицинская генетика, онкология.

Уровень внедрения: республиканские онкологические центры специализирующиеся на лечении пациентов с раком щитовидной железы.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Больные с медуллярным раком щитовидной железы и их близкие родственники. Алгоритм обследования лиц с подозрением на наследственную форму медуллярного рака щитовидной железы представлен на рис. 1.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Не выявлены.

Алгоритм диагностики наследственных форм медуллярного рака щитовидной железы

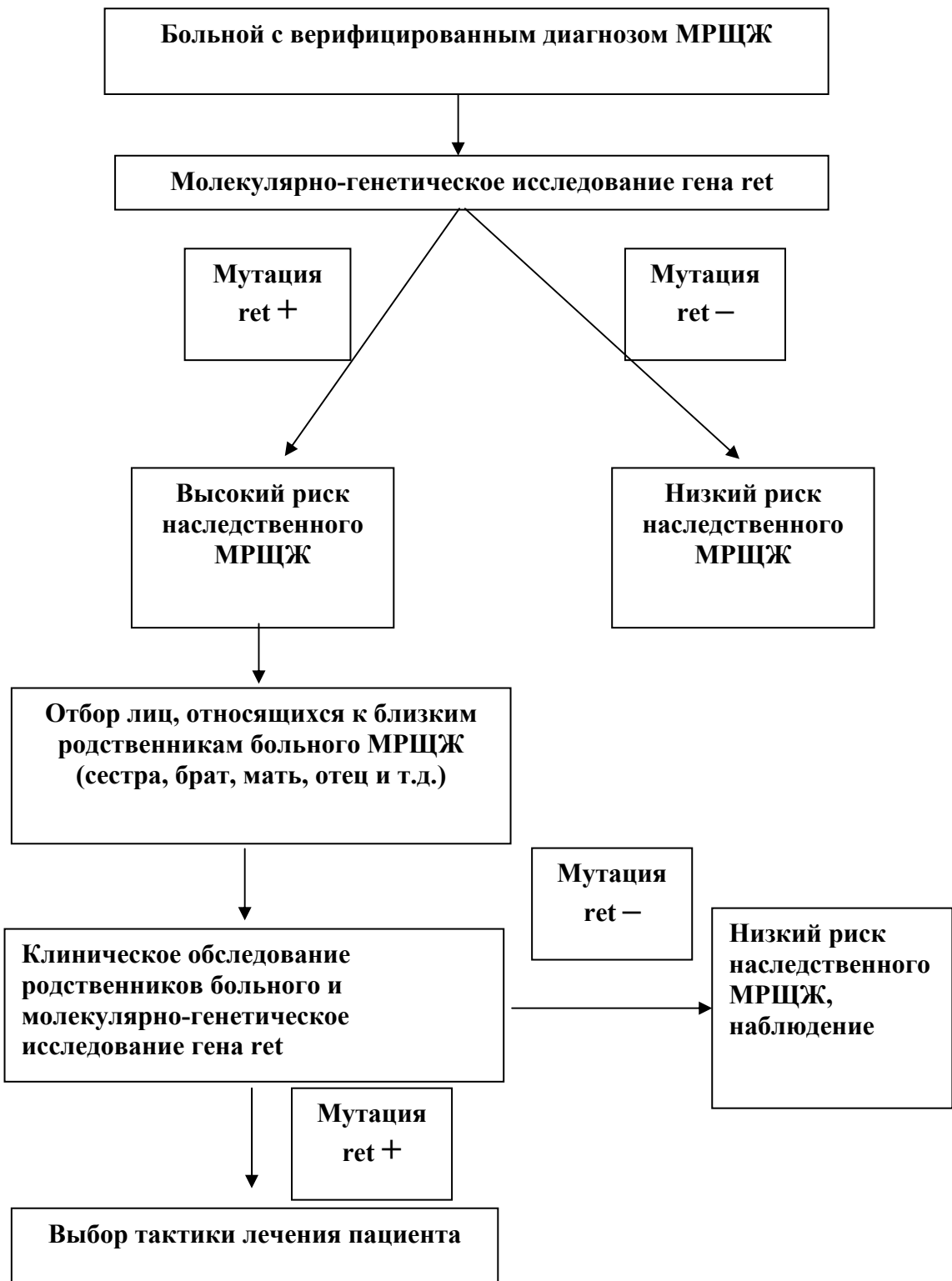


Рис. 1. Алгоритм диагностики наследственных форм медуллярного рака щитовидной железы

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Принцип метода

Для идентификации мутаций в *ret* гене используется амплификация специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с аллель-специфическими праймерами. Анализ продуктов ПЦР проводится с помощью эндонуклеазной рестрикции с последующим разделением в агарозном геле.

Биологический материал

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови.

Идентификация мутаций в 11 и 16 экзонах *ret* гена

1. Перечень необходимого оборудования и реактивов.

Полимеразная цепная реакция

Материалы и оборудование: ламинарный бокс 2 класса защиты, твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99 °С, пипетки-дозаторы переменного объема (5–50; 20–200; 100–1000 мкл), высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8–12 тыс.об/мин; микроцентрифуга-вортекс, пробирки объемом 1,5 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: Taq полимеразы; соответствующий 10X буфер для ПЦР; 25 мМ MgCl²; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); праймеры, фланкирующие участки ДНК, содержащие анализируемые мутации; бидистиллированная деионизированная вода.

Последовательность праймеров, используемых для идентификации мутаций, представлена в табл. 1.

Последовательности праймеров для ПЦР

Название	Последовательность	Экзон ret гена	Количество оснований
Ret20S	CATGAGGCAGAGCATACGCA	11	20
Ret20S-m	CATGAGGCAGCGCATACGCA	11	20
Ret2C	GACAGCAGCACCGAGACGAT	11	20
Ret11F	ATGCTCGATGGGGTGTTC	11	20
Ret11R	TTGTGGGCAAACCTTGTGGTA	11	20
rRet16	TAACCTCCACCCAAGAGAG	16	20
fRet16	AGGGATAGGGCCTGGGCTTC	16	20

Рестрикция ПЦР-фрагментов специфическими эндонуклеазами

Материалы и оборудование: термостат, мини-центрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: рестриктазы (FastDigest NhaI, RsaI и BseGI) и соответствующий 10x буфер для рестрикции.

Проведение электрофоретического разделения продуктов ПЦР

Материалы и оборудование: камера для горизонтального электрофореза; источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В; УФ-трансиллюминатор; СВЧ-печь для плавления агарозы; технические весы для взвешивания агарозы; аквадистиллятор; видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключаемая к персональному компьютеру, мини-центрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: этидиум бромид, бромфеноловый синий, ксиленианол, 40% сахароза, агароза, трис, эдта, маркер молекулярного веса bp50, bp100, H²O.

2. Методика определения мутаций**ПЦР**

Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 25 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 25 мкл содержит по 1 мкмоль/л каждого праймера, 10 ммоль/л трис-HCl (pH 8,3), 50 ммоль/л KCl, 2,5 ммоль/л MgCl², 0,2 ммоль/л дНТФ и 1 Taq-полимеразы.

1. В пробирки для ПЦР внести по 24 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.

2. Пробирки поместить в амплификатор и провести первоначальную денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95 °С.

3. Амплификация: 40 циклов по 1 мин. каждый при 65, 72 и 95 °С, с заключительной инкубацией при 72 °С в течение 5 мин.

4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

Рестрикция ПЦР-фрагментов специфическими эндонуклеазами

Использование специфических эндонуклеаз типа FastDigest позволяет сократить время рестрикции до 15–20 мин., по сравнению с 12 ч при использовании обычных эндонуклеаз.

Рестрикция проводится в течение 5 мин. при 37 °С в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл 10х буфера (FastDigest) для рестрикции, 2 мкл продукта ПЦР, 1 мкл рестриктазы и 15 мкл воды для ПЦР. Специфические эндонуклеазы для анализа каждой мутации указаны в табл. 2.

Таблица 2

Последовательности праймеров для ПЦР

Мутация (кодон, замена нуклеотида)	634 TGC→CGC	634 TGC→TAC	618 ATG→ACG
Рестрикционная эндонуклеаза	HhaI	RsaI	BseGI

Продукты рестрикции подвергаются электрофорезу в 2%-м агарозном геле, содержащем этидиум бромид. Электрофорез проходит в течение 45 мин. при напряжении 150 В и силе тока 150 мА в аппарате для горизонтального электрофореза.

Интерпретация полученных данных

Учет результатов анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК (табл. 3).

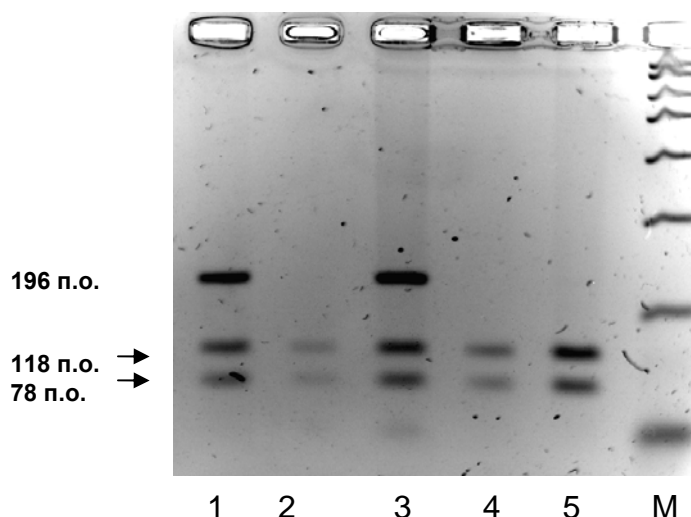
Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

- в отрицательном контроле присутствуют полосы амплифицированной ДНК;
- в положительном контроле отсутствуют полосы, специфические для тестируемой мутации;
- в исследуемых образцах имеются неспецифические полосы различной величины.

Размер фрагментов ДНК наблюдаемых при анализе мутаций

Мутация (кодон <i>ret</i> гена, замена нуклеотида)	Длина фрагментов ДНК (в парах нуклеотидов)	
	Норма	Гетерозиготное носительство
634, TGC→CGC	170	170+110+60
634, TGC→TAC	170	170+110+60
618, ATG→ACG	118+78	196+118+78

Интерпретацию результатов ДНК анализа проводили по схемам представленным на рис. 2–3.



*Рис. 2. Рестрикционный анализ 16 экзона гена *ret* (918 кодон)*

В отсутствие мутации в 16 экзоне гена *ret* (образцы 2,4,5) сайт рестрикции сохраняется в обоих аллелях и в результате рестрикции образуются два продукта (обозначены стрелками). Появление дополнительной полосы, связанное с исчезновением сайта рестрикции для *VseGI*, свидетельствует о присутствии мутации в 16 экзоне в образцах 1 и 3. М – маркер молекулярного веса, п.о. – пар оснований.

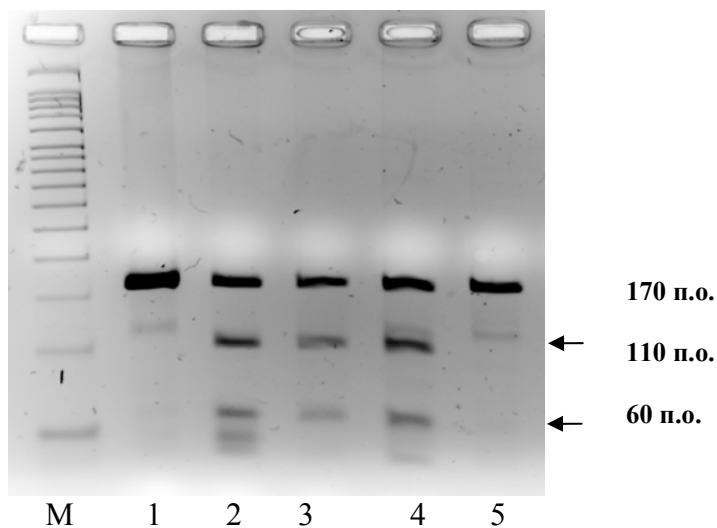


Рис. 3. Рестрикционный анализ 11 экзона гена *ret* (634 кодон)

В отсутствие мутации в 11 экзоне гена *ret* (образцы 1, 5) рестрикции не происходит. Наличие продуктов рестрикции (обозначены стрелками), связанное с появлением сайта рестрикции для *NhaI*, свидетельствует о присутствии мутации в 11 экзоне в образцах 2–4. М — маркер молекулярного веса 50 п.о., п.о. — пары оснований.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано.

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Для предотвращения возможных диагностических ошибок требуется соблюдение следующих правил:

- использовать только химически чистую и, желательнее, стерильную посуду;

- использовать одноразовые пробирки и наконечники для пипеток; стерилизовать применяемые растворы (если допустима их стерилизация) и хранить их разлитыми небольшими порциями;

- работать только с минимально необходимыми объемами растворов;

- перед открыванием крышек пробирок осаждать растворы со стенок центрифугированием;

- в каждую серию проб включать в качестве контроля пробирку с поэтапным внесением всех применяемых растворов, но без ДНК (отрицательный контроль);

- при выделении ДНК и постановке ПЦР лицо сотрудника должно быть защищено экраном либо маской, работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

В молекулярно-генетической лаборатории необходимо выделять несколько зон:

1. Зона экстрагирования ДНК — в ней осуществляют все этапы обработки биологического материала и выделения геномной ДНК.

2. Зона ПЦР предназначена для внесения в пробирки компонентов амплификационной смеси и ДНК, а также для проведения амплификации.

В зонах экстрагирования ДНК и ПЦР (первой и второй) не следует открывать пробирки с продуктами амплификации, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне.

3. В зоне анализа продуктов ПЦР проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.