

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

В.А. Ходжаев

27.09.2010 г.

Регистрационный № 075-0610

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОМЕТАСТАЗОВ РАКА  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КОСТНОМ МОЗГЕ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ  
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова

АВТОРЫ: д-р. биол. наук. Р.М. Смолякова, д-р. мед. наук., проф.  
Э.А. Жаврид, д-р. мед. наук Н. Н. Антоненкова, канд. мед. наук.  
Е.В. Баранов, М.Н. Клименков, И.А. Каргузова, к.м.н А.Ч. Дубровский,  
С.П. Козловская

Минск 2010

## **ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

РМЖ	– рак молочной железы
ОТ-ПЦР	– полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
СК-19	– цитокератин-19
hMAM	– маммоглобин

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Инструкция разработана с целью определения микрометастазов в костном мозгу операбельных больных, страдающих раком молочной железы промежуточной и высокой групп риска по экспрессии генов СК-19, hMAM.

Область применения: онкология, медицинская генетика, молекулярная биология, клиническая лабораторная диагностика.

Уровень внедрения: специализированные онкологические центры, диспансеры.

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

*Перечень необходимого оборудования:*

1. Центрифуга 1000–5000 об./мин.
2. Световой микроскоп.
3. Микроцентрифуга 2200–13000 об./мин.
4. Термостат.
5. Автоматические пипетки переменного объема.
6. Амплификатор.
7. Амплификатор с оптическим модулем.

*Реактивы и расходные материалы:*

1. Камера Горяева.
2. Покровные стекла.
3. Лабораторная посуда (колбы, пробирки, наконечники, стаканы, стрипы или 96-луночные планшеты).
4. Histopaque.
5. Среда RPMI 1640 (без Ca<sup>++</sup> и Mg<sup>++</sup>).
6. Раствор Хэнкса.
7. Уксусная кислота 3%.
8. Перекись водорода 3%.
9. Набор для выделения РНК.
10. Набор для обратной транскрипции.
11. Набор реагентов TaqMan Universal PCR Master Mix для определения экспрессии генов СК-19, hMAM и β-актина.
12. Деионизированная вода.

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ:

Рак молочной железы.

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ:

Не выявлены.

### Описание технологии определения экспрессии генов СК-19, hMAM методом real-time PCR

#### *I этап. Забор биологического материала*

Забор костно-мозговой жидкости из грудины осуществляется под местной или общей анестезией в вакутайнер с сиреневой крышкой.

Необходимый объем — 4 мл. Первые 500 мкл костно-мозговой жидкости во избежание контаминации эпителиальными клетками при исследовании не используются (удаляются).

Поступление биологического материала в лабораторию для проведения молекулярно-генетических исследований — в течение 30 мин.

#### *II этап. Выделение мононуклеаров из образцов костного мозга*

Довести Histopaque до комнатной температуры.

Развести 3 мл костного мозга средой RPMI (без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ).

В чистую пробирку на 15 мл внести 3 мл Histopaque.

Аккуратно и осторожно наслаивать на Histopaque разведенный костный мозг.

Центрифугировать при 400 об./мин в течение 30 мин при комнатной температуре. В результате центрифугирования образуются следующие фракции:

- на дне пробирки — эритроциты;
- фракция полиморфно-ядерных лейкоцитов сосредоточивается в виде тонкого слоя непосредственно между фазой эритроцитов и фазой градиента;
- бесцветный слой градиента;
- фракция опухолевых клеток — между слоями плазмы и градиентом;
- слой жидкости желто-розового цвета (плазма).

6. Отобрать верхние 2/3 части раствора, находящегося над интерфазой, в контейнер для отходов.

7. Оставшуюся нижнюю часть, т.е. 1/3 раствора над интерфазой, собрать вместе с интерфазой, держа наконечник над последней, круговыми движениями по стеночке пробирки в новую, чистую пробирку на 15 мл.

8. Отмыть в течение 10 мин центрифугированием при 250 об./мин фракцию мононуклеарных клеток в 10 мл раствора Хэнкса.

9. При необходимости повторить процедуру отмывки в 5 мл раствора Хэнкса при аналогичных параметрах центрифугирования.

10. Добавить к осадку опухолевых клеток 3 мл раствора.

11. В отдельную пробирку налить 0,8 мл раствора 3% уксусной кислоты, пипеткой набрать 20 мкл взвеси опухолевых клеток и аккуратно внести ее

в пробирку с 3% уксусной кислотой. Смесь хорошенько перемешать. В результате выделения получить рабочее разведение 1:40.

12. Заполнить камеру Горяева смесью клеток с уксусной кислотой.

13. После заполнения оставить камеру на 1 мин при комнатной температуре для оседания клеток. Подсчитать клетки в 100 больших квадратах.

14. Результаты подсчета опухолевых клеток в больших квадратах суммировать и вычислить их количества в 1 мл костного мозга (КМ) по формуле:

$$\text{количество клеток в 1 мл КМ} = \frac{a \times 4000 \times 40}{1600} \times 10^3 \text{ или } a \times 10^5,$$

где **a** — количество клеток в 1 мл костного мозга, подсчитанных в 100 больших квадратах, 1600 — количество малых квадратов, 40 — разведение костного мозга, 4000 — множитель, приводящий результат к объему 1 мкл костного мозга, исходя из объема малого квадрата (1/4000 мкл),  $10^3$  — множитель, приводящий результат к 1 мл костного мозга.

15. Записать концентрацию подсчитанных клеток в 1 мл.

### *III этап. Выделение РНК*

Выделение РНК из опухолевых клеток костного мозга осуществляется с использованием наборов для выделения РНК.

1. На выделение РНК отобрать необходимый объем, содержащий 10 млн. клеток, и внести в эппендорф вместимостью 1,5 мл. Промаркировать пробирки. Центрифугировать при 5000 об./мин в течение 15–20 с. Затем аккуратно отобрать надосадочную жидкость (не захватить клетки!). К осадку внести 350 мкл лизирующего раствора.
2. Пробы тщательно перемешать на вортексе до полной гомогенизации раствора.
3. Добавить 350 мкл 64% этанола к лизату, тщательно перемешать на вортексе.
4. Аккуратно перенести полученную смесь, используя наконечники с аэрозольным барьером, в пробирку с фильтром (поставляется в наборе). Центрифугировать в течение 1 мин при 10000 об./мин.
5. Аккуратно извлечь фильтр и удалить жидкость из пробирки, установить фильтр на место. Добавить в пробы по 700 мкл отмывочного раствора № 1 (Wash Solution №1), процентрифугировать в течение 1 мин при 10000 об./мин.
6. Аккуратно извлечь фильтр и удалить жидкость из пробирки, установить фильтр на место. Добавить 500 мкл отмывочного раствора № 2 (Wash Solution № 2), процентрифугировать в течение 1 мин при 10000 об./мин.
7. Аккуратно извлечь фильтр и удалить жидкость из пробирки, установить фильтр на место. Добавить 500 мкл отмывочного раствора № 2 (Wash Solution № 2), процентрифугировать в течение 1 мин при 10000 об./мин.
8. Поместить фильтр в чистую пробирку вместимостью 1,5 мл.

9. Внести 50 мкл предварительно нагретого до температуры 75°C раствора для элюции РНК, центрифугировать в течение 1 мин при 10000 об./мин.
10. Повторно внести 50 мкл предварительно нагретого до температуры 75°C раствора для элюции РНК, центрифугировать в течение 1 мин при 10000 об./мин.
11. Удалить фильтр, отобрать раствор в чистую пробирку, используя наконечники с аэрозольным барьером для проведения этапа очищения полученной РНК от остаточного содержания ДНК:
  - К образцу РНК (100 мкл) внести 10 мкл 10×DNase 1 Buffer и 1 мкл DNase 1 и тщательно перемешать пипетированием. Поместить пробирки в термостат при 37°C на 20 мин.
  - Внести 10 мкл реагента для инактивации DNase, тщательно перемешать пипетированием и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая пробирки на вортексе.
  - Центрифугировать 1 мин при 10000 об./мин на микроцентрифуге (с целью осаждения реагента для инактивации DNase). Перенести очищенный от ДНК раствор РНК в чистую пробирку, используя наконечники с аэрозольным барьером.

Концентрацию полученной РНК проверить спектрофотометрически. Полученный раствор РНК подлежит использованию для постановки реакции обратной транскрипции.

#### *IV этап. Этап обратной транскрипции*

Для получения сДНК, 2 мкг общей РНК обратно транскрибируются в конечном объеме 100 мкл с применением набора для обратной транскрипции **High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit**.

Реагенты	В расчете на одну пробу
10×RT buffer	2
25×dNTP	0,8
10×RT random primer	2
Multiscribe Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor	1
Деионизированная вода	3,2
RNA (в расчете 5 мкг в реакцию)	10

Реакция обратной транскрипции проводится по следующему протоколу в амплификаторе:

- 25°C в течение 10 мин;
- 37°C в течение 120 мин;
- 85°C в течение 5 с;
- охлаждение до 4°C.

Полученная кДНК при необходимости подлежит хранению при температуре минус 70°C и однократному размораживанию.

*V этап. Определение экспрессии генов СК-19 и hMAM в костном мозгу операбельных больных, страдающих раком молочной железы*

1. Приготовить реакционную смесь реагентов для амплификации из расчета на одну пробу:

Компонент реакционной смеси	СК-19, мкл/образец	Компонент реакционной смеси	hMAM, мкл/образец
2×PCR Master Mix	25	2×PCR Master Mix	25
forward primer (0,3 мкМ)	0,75	forward primer (0,9 мкМ)	2,25
forward primer (0,3 мкМ)	0,75	forward primer (0,9 мкМ)	2,25
probe (0,15 мкМ)	0,75	probe (0,2 мкМ)	1
20×Endogenous control	2,5	20×Endogenous control	2,5
Не содержащая нуклеаз вода		деионизированная вода	

2. Внести в стрипы (планшету) по 44 мкл готовой реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

3. Добавить 6 мкл кДНК-пробы в стрипы (планшету) с реакционной смесью, используя наконечник с аэрозольным барьером. Аккуратно перемешать пипетированием.

4. Поставить отрицательный контроль ПЦР: в стрипы внести по 6 мкл воды.

5. Поместить стрипы (планшету) в амплификатор в режиме реального времени.

Условия амплификации:

- 50°C в течение 2 мин — активация фермента урацил-N-гликозилазы;
- 95°C в течение 10 мин — активация фермента ДНК-полимеразы;
- 95°C в течение 15 с — плавление матрицы;
- 60°C в течение 1 мин — отжиг зонда с праймером и наращивание цепи.

} 50 циклов

*VI этап. Анализ результатов*

ПЦР-анализ проводится на амплификаторе с оптическим модулем.

Количество мРНК СК-19 и hMAM анализируется в триплетах с использованием среднего значения Ct.

Результаты нормируют на эндогенный контроль (β-актин) и выражают по отношению к пороговому значению. Пороговые значения Ct определялись по

результатам, полученным в ходе исследования костного мозга лиц, не имеющих опухолей молочной железы и других опухолей эпителиального происхождения (злокачественные лимфомы).

### **ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ**

Ошибочные результаты при исследовании уровня экспрессии генов СК-19, hMAM молекулярно-генетическим методом могут быть получены при:

- нарушениях в технологии забора костного мозга;
- увеличении времени транспортировки костного мозга в лабораторию;
- использовании реагентов с истекшим сроком годности;
- неточном дозировании реагентов;
- нарушениях в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

С целью контроля эффективности ПЦР-анализа необходимо включение в число тестируемых образцов при каждой процедуре анализа положительных и отрицательных контролей. Для повышения точности метода необходимо исключить вероятность контаминации эпителиальными клетками образцов, реактивов и оборудования. Для повышения чувствительности и специфичности анализа необходимо добиться отсутствия ферментов, разрушающих РНК.