

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

27.09.2010 г.

Регистрационный номер 088-0710

**МЕТОД ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ТКАНЕВЫХ МАРКЕРОВ
И ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ
С ГЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО
АНАЛИЗА И ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ *IN SITU***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д-р биол. наук Р.М. Смолякова, канд. мед. наук А.Ч. Дубровский,
канд. мед. наук А.Г. Жуковец, М.А. Возмитель, Н.В. Сысоева, Т.И. Кирченко

Минск 2010

Перечень используемых сокращений

ОГМ	— опухоли головного мозга
ИГХ	— иммуногистохимия
EGFR (РЭФР)	— рецептор к эпидермальному фактору роста I типа
EGF (ЭФР)	— эпидермальный фактор роста
FISH	— флюоресцентная гибридизация <i>in situ</i>
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
p53	— мутантный супрессор опухолевого роста
1p, 19q	— 1 и 19 хромосомы

Показания к применению

Инструкция разработана с целью определения экспрессии тканевых маркеров EGFR, p53, хромосомных aberrаций 1p и 19q, амплификации гена EGFR у пациентов с высокозлокачественными глиальными опухолями головного мозга для диагностики и выбора тактики лечения.

Область применения: онкология, патологическая анатомия, медицинская цитогенетика, молекулярная биология.

Уровень внедрения: специализированные онкологические центры, диспансеры, патологоанатомические отделения и бюро.

Перечень необходимого оборудования, реагентов и расходных материалов

Оборудование:

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной не более 4 мкм.
2. pH-метр.
3. Термостат.
4. Автоматические пипетки переменного объема.
5. Баня водяная с датчиком температуры.
6. Световой микроскоп, флюоресцентный микроскоп.
7. Гибридизер.
8. Соответствующие наборы фильтров (Green Filter, Orange Filter, DAPI/9 Filter).
9. Таймер/секундомер.

Реактивы и расходные материалы:

1. Силанизированные предметные стекла.
2. Покровные стекла.
3. Лабораторная посуда (колбы, пробирки, стеклянные палочки, воронки, стаканы, контейнеры для предметных стекол).
4. Ксилол.
5. 70, 80, 96 и 100% спирт.
6. Перекись водорода 3%.
7. Tris-HCl – отмывочный буфер, pH=7,5.

8. Буфер для разведения специфических антител .
9. Буфер для демаскировки антигенов, рН=6,0.
10. Буфер для демаскировки антигенов, рН=9,0.
11. Первичные антитела к p53, EGFR (Обязательным условием является наличие в спецификации указания о возможности использования на формалин-фиксированных тканях человека.)
12. Пробы для определения делеций LSI 1p36/LSI 1q25, LSI 19q13/LSI 19p13.
13. Системы визуализации к мышинным и кроличьим антителам или универсальная система (En Vision⁺).
14. Диаминобензидин (DAB).
15. Канадский бальзам.
16. Карандаш для ИГХ.
17. Гематоксилин Майера.
18. Промывочный буфер 0,4x SSC/0,3%.
19. Промывочный буфер 2x SSC/0,1%.
20. Промывочный буфер 20x SSC.
21. Набор реагентов для предварительной обработки парафиновых срезов, включающий:
 - Раствор для предварительной обработки (NaSCN).
 - Протеаза /пепсин (2500-3000 ед/мг).
 - Буфер для протеазы (раствор NaCl, рН 2,0).
22. Резиновый клей.
23. DAPI II Counterstain.
24. Деионизированная вода.
25. Концентрированная HCl, 1N NaOH.

Показания к применению: высокозлокачественные глиальные опухоли головного мозга.

Противопоказания к применению: не выявлены.

Технология использования иммуногистохимического метода определения экспрессии p53 (клон DO-7)

I этап. Депарафинирование и обезвоживания.

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола на 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° на 3 мин.
3. Промыть срезы в трех порциях дистиллированной воды и поместить последовательно в две порции дистиллированной воды по 5 мин.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин.

1. Поместить срезы в емкость с демаскировочным буфером pH=9,0 и погрузить на 10 мин в водяную баню при $t = 96-99^{\circ}\text{C}$.
2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.
3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.
4. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.
5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.
2. Нанести первичное антитело (анти-p53), разведенное 1:300 в Antibody Diluent. Слайды разместить горизонтально в герметичной емкости, дно которой покрыть фильтровальной бумагой, смоченной водой. Емкость поместить в холодильник на ночь.
3. Слить со срезов жидкость.
4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
5. Нанести на срезы визуализирующую систему EnVision+ на 30 мин.
6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
7. Нанести раствор ДАБ. Раствор ДАБ, который готовя в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы, инкубировать 6-8 мин.

8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.

9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и составляет 40-60 с.

10. Промыть дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов

1. Обезвоживание в спиртах.

2. Просветление в ксилоле.

3. Заключение в канадский бальзам.

Критерии оценки маркера p53:

– опухоль считали отрицательной по p53, если в ткани опухоли отсутствовала ядерная реактивность с антителами или количество окрашенных клеток составляло менее 10%;

– положительной по p53, если окрашено более 10% ядер опухолевых клеток, причем слабopозитивной – при 10–30%, умеренно позитивной – при 31–50% и сильнопозитивной – при более 50%.

Технология использования иммуногистохимического метода определения экспрессии EGFR (клон E30)

I этап. Депарафинирование и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола на 10 мин.

2. Стекла поместить последовательно в 3 порции этанола 96° на 3 мин.

3. Промыть срезы в трех порциях дистиллированной воды и поместить последовательно в две порции дистиллированной воды на 5 мин.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин.

1. Поместить срезы в емкость с демаскировочным буфером pH=6,0 и погрузить на 10 мин в водяную баню при $t = 96-99^{\circ}\text{C}$.

2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.

3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.

4. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.

5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции

Срезы обвести карандашом для ИГХ.

2. Нанести первичное антитело (анти-EGFR), разведенное 1:25 в Antibody Diluent, и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин.

3. Слить со срезов жидкость.

4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

5. Нанести на срезы визуализирующую систему EnVision+ на 30 мин.

6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

7. Нанести раствор ДАБ, приготовленный в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы, и инкубировать 6-8 мин.

8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.

9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и составляет 40-60 с.

10. Промыть дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов

1. Обезвоживание в спиртах.

2. Просветление в ксилоле.

3. Заключение в канадский бальзам.

Критерии оценки маркера EGFR:

– опухоль считали отрицательной по EGFR при отсутствии мембранного окрашивания или при окрашивании менее 10% клеток;

– опухоль оценивали в 1 балл (1+) при неполном окрашивании мембран у более 10% клеток;

– в 2 балла (2+) при интенсивности окраски мембран от слабой до умеренной у более 10% клеток;

– в 3 балла (3+) при полном окрашивании мембран более 10% клеток.

Определение делеций LSI 1p36 / LSI 1q25 и LSI 19q13 / LSI 19p13, амплификации LSI EGFR методом флюоресцентной гибридизации in situ

Технология использования метода флюоресцентной гибридизации in situ (FISH)

I этап. Депарафинизация и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в три порции ксилола по 5 мин.
2. Слайды поместить последовательно в две порции этанола 96° по 2 мин.
3. Стекла высушить на воздухе 5-7 мин.

II этап. Предобработка (проводилась в соответствии с инструкцией из используемого набора)

1. Слайды поместить в предварительно нагретый буфер Pretreatment Solution до 80°C на водяной бане на 10 мин.
2. Промыть слайды в деионизированной воде 3 мин.
3. Поместить слайды в Protease Buffer в водяную баню при 37°C на 15 мин.
4. Промыть слайды в деионизированной воде 3 мин.
5. Слайды высушить на воздухе 5-7 мин.

III этап. Гибридизация и денатурация

1. Обезвоживание срезов: последовательно поместить слайды в 70, 85 и 100% этанол по 1 мин.
2. Приготовленную ДНК-mix-пробу нанести в количестве 10 мкл на слайд и немедленно накрыть покровным стеклом. Края заклеивают резиновым клеем.
3. Поместить слайды в гибридизер и запустить программу ко-гибридизации (денатурация 5 мин при 73°C, гибридизация при 37°C в течение 16 ч).

IV этап. Отмывка слайдов

1. После гибридизации снять покровные стекла, поместить слайды в промывочный буфер 0,4x SSC/0,3%, предварительно нагретый на водяной бане до 73°C, на 2 мин.

2. Промыть слайды в 2х SSC/0,1% при комнатной температуре 10 мин.

3. Слайды высушить на воздухе в темноте 5-7 мин.

V этап. Визуализация гибридизации

1. Нанести 15 мкл Counterstain (DAPI II) на срез и накрыть покровным стеклом.

2. Оценить результаты по окрашенным слайдам на флюоресцентном микроскопе, используя соответствующие наборы фильтров (Spectrum Green, Spectrum Orange).

Критерии оценки: подсчет красных и зеленых сигналов минимум в 100 ядрах. Положительным считали результат при отношении красных сигналов к зеленым $>2,0$.

Возможные ошибки

Ошибочные результаты при исследовании тканевых маркеров могут быть получены при:

- использовании реагентов с истекшим сроком годности;
- неточном дозировании реагентов;
- неправильном заборе и фиксации патоморфологического материала;
- нарушениях в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т.д.).

С целью повышения специфичности реакции необходимо включение анализа положительных и отрицательных контролей в число тестируемых образцов при каждой процедуре.