

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

Д.Л. Пиневич

«16» декабря 2016 г.

Регистрационный № 109-1216



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ микроРНК
ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЕ КОЖИ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

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

Авторы:

д.б.н., доцент Р.М. Смолякова, к.м.н. Е.И. Субоч, А.М. Пашкевич,
М.В. Якимова, к.м.н. А.Г. Жуковец

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

16.12.2016

Регистрационный № 109-1216

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ микроРНК
ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЕ КОЖИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р биол. наук, доц. Р.М. Смолякова, канд. мед. наук Е.И. Субоч,
А.М. Пашкевич, М.В. Якимова, канд. мед. наук А.Г. Жуковец

Минск 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения уровня экспрессии панели микроРНК (мкРНК-182, мкРНК-221, мкРНК-222, мкРНК-214, мкРНК-21, мкРНК-200b, мкРНК-15b) с использованием технологии полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР) в режиме реального времени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по лечению метастатической меланомы кожи.

Метод предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-патологоанатомов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим метастатической меланомой кожи.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

1. Бокс биологической безопасности 2 класса (тип В2 — без рециркуляции).
2. Термостат твердотельный с функцией охлаждения (4–100°C).
3. Вортекс.
4. Микроцентрифуга, обеспечивающая скорость вращения ротора до 14000 об./мин.
5. Амплификатор (термоциклер) для проведения ПЦР в режиме реального времени.
6. Автоматические дозаторы переменного объема.
7. Холодильник (2–8°C).
8. Низкотемпературный морозильник (-70°C).

Реактивы и расходные материалы:

1. Набор реагентов для выделения общей фракции РНК (сорбционный принцип).
2. Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции микроРНК.
3. Набор реагентов для амплификации микроРНК с использованием ПЦР в режиме реального времени.
4. Олигонуклеотиды синтетические (праймеры).
5. Ксилол.
6. Спирт этиловый 96%.
7. Микропробирки объемом 1,5 мл.
8. Микропробирки объемом 0,2 мл или микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, имеющие маркировку для ПЦР и оптические крышки к ним.
9. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.
10. Хладоэлемент или охладитель проб.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метастатическая меланома кожи.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Требования, предъявляемые к материалу для исследования

Для проведения исследования используется опухолевая ткань меланомы кожи, фиксированная 10%-м раствором нейтрального формалина и заключенная в парафин (срок хранения образцов не более 6 лет). Парафиновый блок должен содержать ткань меланомы с сохраненной структурой, отсутствием некроза и геморрагий, а также объемом опухолевой ткани не менее 75% от общего объема гистологического материала. Выбор блока ткани для исследования проводится врачом-патологоанатомом, обладающим знаниями в области опухолевой патологии кожи.

2. Выделение общей фракции РНК из опухолевой ткани, фиксированной формалином и заключенной в парафиновые блоки.

Для исследования используются набор реагентов для выделения общей фракции РНК, основанный на сорбционном принципе согласно инструкции производителя, ксилол, спирт этиловый 96%. Чистота препарата и концентрация полученной РНК оцениваются спектрофотометрически, исходя из соотношения поглощения при длинах волн 260/280 нм.

При необходимости допускается хранение РНК при температуре -20°C в течение 1 мес. и однократное размораживание.

3. Постановка реакции обратной транскрипции

Для синтеза кДНК, который проводится непосредственно после получения общей фракции РНК, используется набор реагентов для постановки реакции обратной транскрипции микроРНК согласно инструкции производителя.

При необходимости допускается хранение кДНК при температуре -20°C в течение 1 мес. и однократное размораживание.

4. Постановка ПЦР в режиме реального времени

Для проведения ПЦР в режиме реального времени фрагментов кДНК генов микроРНК применяется набор реагентов для амплификации микроРНК и праймеры согласно инструкции производителя. В качестве референсного гена используется RNU6.

5. Анализ результатов

Для оценки уровня экспрессии микроРНК используется метод dCt .

5.1. Получают значения уровня флуоресценции для каждого образца. Полученные числовые значения обозначают Ct .

5.2. Вычисляют значения dCt для образцов опухолевой ткани согласно следующей формуле:

$$dCt_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{МИШЕНЬ}} = Ct_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{МИШЕНЬ}} - Ct_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{РЕФЕР.ГЕН}}$$

где $dCt_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{МИШЕНЬ}}$ — экспрессия гена-мишени в опухолевой ткани, нормализованная по референсному гену;

$Ct_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{МИШЕНЬ}}$ — значение уровня флюоресценции образца опухолевой ткани, анализируемого для оценки экспрессии гена-мишени;

$Ct_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{РЕФЕР.ГЕН}}$ — значение уровня флюоресценции образца опухолевой ткани, анализируемого для оценки экспрессии референсного гена.

5.3. Оценивают уровни экспрессии генов микроРНК.

5.4. Критериями метастатической меланомы являются:

- уровень экспрессии микроРНК-21 выше 4,28 отн. ед.;
- уровень экспрессии микроРНК-214 выше 7,31 отн. ед.;
- уровень экспрессии микроРНК-182 выше 10,70 отн. ед.;
- уровень экспрессии микроРНК-221 выше 7,95 отн. ед.;
- уровень экспрессии микроРНК-222 выше 6,59 отн. ед.;
- уровень экспрессии микроРНК-200b ниже 0,95 отн. ед.;
- уровень экспрессии микроРНК-15b ниже 0,87 отн. ед.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Использование реагентов с истекшим сроком годности или реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: не использовать реагенты с истекшим сроком годности и соблюдать условия их хранения.

2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно поверять автоматические дозаторы переменного объема.

3. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.