

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневиц
«29» мая 2013
Регистрационный № 122-1013

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ МАРКЕРОВ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ПРОЦЕССА В ТКАНИ
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и
экологии человека»

АВТОРЫ:

к.б.н. Силин А.Е., Мартинков В.Н., к.м.н. Надыров Э.А., Пестриков Е.В.,
Либуркин О.М., Задорожнюк А.А., Тропашко И.Б., Силина А.А.,
Мартыненко С.М.

Гомель, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

29.11.2013

Регистрационный № 122-1013

**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО
ТЕСТИРОВАНИЯ МАРКЕРОВ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ПРОЦЕССА
В ТКАНИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.Е. Силин, В.Н. Мартинков, канд. мед. наук
Э.А. Надыров, Е.В. Пестриков, О.М. Либуркин, А.А. Задорожнюк, И.Б. Тропашко,
А.А. Силина, С.М. Мартыненко

Гомель 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью расширения спектра диагностических маркеров рака предстательной железы посредством определения статуса метилирования 3-х генов-супрессоров (GSTP1, CCND2 и APC). Описанный в инструкции метод может быть применен для выявления злокачественного процесса с использованием в качестве материала ткани предстательной железы, взятой посредством пункционной биопсии (ПБ). Предназначена для врачей-онкологов, врачей лабораторной диагностики.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Высокоскоростная микроцентрифуга (до 10000–12000×g) с ротором для пробирок типа “eppendorf” 1,5 мл.

Термодостойкий термостат.

Микроцентрифуга-вортекс.

Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл).

Насос с колбой-ловушкой.

ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха.

Спектрофотометр для определения количества и качества выделенной ДНК.

Амплификатор ДНК.

Камера для горизонтального агарозного гель-электрофореза.

Источник питания с постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 200 В.

УФ-трансиллюминатор с фотокамерой для съемки в УФ-свете.

Набор расходных материалов: резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 или 2 мл, ПЦР-пробирки на 0,2 мл, стеклянные пестики, штативы для пробирок на 1,5 и 0,2 мл, стеклянная химическая посуда и др.

Основной набор реагентов для пробоподготовки и проведения МС-ПЦР включает в себя следующие компоненты: готовый коммерческий набор для экстракции ДНК из ткани, готовый коммерческий набор для бисульфитной модификации ДНК, буферный раствор для ПЦР, термостабильная ДНК-полимераза для «горячего старта» (Hot Taq-полимераза), 25 мМ MgCl₂, смесь нуклеотидтрифосфатов НТФ (dNTP mix), специфические олигонуклеотидные праймеры 10 мМ р-р, вода ПЦР-качества.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Необходимость дифференциальной диагностики доброкачественной гиперплазии предстательной железы и рака предстательной железы при наличии гистологической картины, подозрительной в отношении малигнизации при несоответствии клинических и лабораторных данных гистологической картине биоптата.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Материал для исследования

Материалом для выделения ДНК с целью анализа метилирования является ткань предстательной железы, взятая посредством ПБ. Процедура забора ткани осуществляется в процедурных кабинетах и может быть сопряжена с забором ткани для гистологического анализа. Ткань после забора переносится в центрифужную пробирку типа “eppendorf” объемом 1,5 мл, содержащую, в зависимости от величины образца от 50 до 100 мкл физраствора. Для хранения до этапа выделения ДНК образцы помещают в морозильную камеру при температуре -20°C .

Выделение и очистка образцов ДНК осуществляется обычным способом посредством соответствующих наборов реагентов. Наиболее эффективная и экономичная методика предлагается разработчиками наборов, основанных на солевом методе выделения ДНК.

Анализ метилирования методом МС-ПЦР предусматривает этап модификации ДНК бисульфитным методом. Для этого используются готовые наборы для бисульфитной модификации.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при $2-8^{\circ}\text{C}$. Более длительное хранение производится при -20°C .

2. Проведение полимеразной цепной реакции

2.1. Специфические праймеры для анализа метилирования генов GSTP1, APC и CCND2 методом МС-ПЦР

Для анализа метилирования проводят две независимые ПЦР и соответственно используют две пары праймеров — для выявления неметилированной ДНК и определения метилированной последовательности. Каждая пара праймеров используется в соответствующей независимой ПЦР. Нуклеотидная последовательность праймеров и основные параметры ПЦР представлены в табл.

Таблица — Праймеры для анализа метилирования генов GSTP1, APC и CCND2 и оптимальные условия проведения МС-ПЦР

Ген	Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'	Параметры ПЦР	
			MgCl ₂ , mM	T _{отжига} , °C
GSTP1	MS-F	TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	2,5	59
	MS-R	GCCCSAATACTAAATCACGACG		
	UMS-F	GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT		
	UMS-K	CCACCSAATACTAAATCACAAC A		
APC	APCUM-F	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	2,5	61
	APCUM-R	ССААТСААСАААСТСССААСАА		
	APCM-F	TATTGCGGAGTGCGGGTC		
	APCM-R	TCGACGAACTCCCGACGA		
CCND2	D2UM-F	AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT	2,5	56
	D2UM-R	ACATCCTCACCAACCCTCCA		
	D2M-F	GGCGGATTTTATCGTAGTCG		
	D2M-R	CTCCACGCTCGATCCTTCG		

2.2. Условия проведения полимеразной цепной реакции

Состав реакционной смеси для проведения специфической к метилированию ПЦР является следующим: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР буфер (200 mM Трис-НСl, рН 8,3, 200 mM КСl, 50 mM (NH₄)₂SO₄); 1 мкл 10 mM смеси dNTP; 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера; 2,5 мкл 25 mM MgCl₂; 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5 ед./мкл); 1 мкл образца модифицированной ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. Для ПЦР используются специальные пробирки объемом 0,2 мл.

Общая схема программы для амплификатора выглядит следующим образом: начальная денатурация — 4 мин при 95°C, затем 35 циклов 30-секундной денатурации при 94°C, отжиг праймеров — 30 с при температуре 56–61°C (табл.) и элонгация 30 с при 72°C. В завершении финальная элонгация 5 мин при 72°C и охлаждение до 4°C.

3. Электрофоретическая детекция результатов МС-ПЦР

3.1. Подготовка геля и буферных растворов

Детекция результатов амплификации осуществляется посредством агарозного гель-электрофореза и окраски бромистым этидием в электрофоретической камере для горизонтального агарозного гель-электрофореза.

Для проведения электрофоретического анализа необходимо приготовление четырех основных растворов реагентов. Для удобства использования изначально готовят концентрированные (стоковые) растворы, из которых затем путем добавления дистиллированной и деионизированной воды формируют рабочие растворы.

1. Подготовка стокового раствора 0,5 М EDTA, рН = 8,0

Реагенты	Концентрация	На 100 мл
EDTA	0,5 М	18,62 г
NaOH	~0,5 М	2,028 г
H ₂ O		88,95 мл

EDTA не растворяется в воде при кислом рН, поэтому при растворении нужно добавлять щелочь и контролировать рН. Хранят раствор при 4°C.

2. Подготовка трис-ЭДТА-боратного стокового раствора (20×)

Реагенты	Концентрация 1×	Концентрация 20×	Сток	На 500 мл
Трис	89 mM	1,78 М	121,14 г/М	107,8 г
Борная кислота	89 mM	1,78 М	61,83 г/М	55,03 г
EDTA 0,5 М, рН 8,0	2 mM	40 mM	500 mM	40 мл
H ₂ O				863,3 мл

Рабочий раствор 1× ТБЕ буфера готовят путем разведения 50 мл стокового раствора буфера (20×) до объема 1 л дистиллированной водой. Затем добавляют 50 мкл стокового раствора бромистого этидия (1%).

3. Подготовка стокового раствора бромистого этидия 10 мг/мл (1%)

Реагенты	На 10 мл
Бромистый этидий	0,1 г
H ₂ O	до 10 мл

4. Подготовка стокового (4×) загрузочного буфера для образцов

Реагенты	Концентрация	На 40 мл
Бромфеноловый синий 2%	0,05%	1 мл
Глицерин 100%	70%	28 мл
H ₂ O		11 мл

3.2. Проведение электрофореза

Процедура проведения электрофореза в стандартной камере для горизонтального агарозного электрофореза выглядит следующим образом:

1. Агарозу для электрофореза в количестве 1,7 г поместить в термостойкую стеклянную колбу на 250 мл. Добавить 100 мл рабочего раствора 1× ТБЕ буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного расплавления агарозы.

2. Залить расплавленную агарозу в специальную форму и установить гребенки в пазы на кювете.

3. После полного застывания геля извлечь гребенки, не повреждая лунки. Поместить кювету с гелем в камеру для электрофореза. Залить в камеру для электрофореза рабочий раствор 1× ТБЕ буфера так, чтобы слой буфера на 5 мм покрывал гель.

4. Добавить к каждому образцу (25 мкл амплификационной смеси) по 8 мкл 4× загрузочного буфера. Перемешать пипетированием.

5. Через слой буфера в отдельные лунки внести пипеточным дозатором по 6–10 мкл смеси ампликонов и загрузочного буфера, положительный, отрицательный контроли и маркер молекулярного веса.

6. Закрыть электрофоретическую камеру защитной крышкой и подключить электрофоретическую камеру к источнику питания, соблюдая полярность подключения.

7. Электрофорез проводить при начальных параметрах тока в источнике питания 40 Вт, 170 В, 400 мА в течение 25–30 мин.

3.3. Интерпретация результатов электрофоретического анализа

Учет результатов провести визуально с помощью УФ-трансиллюминатора. По окончании электрофореза необходимо извлечь агарозный гель из гелевой рамки и поместить на стекло трансиллюминатора и включить прибор. При наличии видеосистемы детекции (фотоаппарат с фильтром) произвести фотосъемку. В случае отсутствия видеосистемы результаты оцениваются визуально при обязательном покрытии геля защитным экраном, предотвращающим УФ-излучение.

Примеры электрофоретической детекции метилирования генов GSTP1, APC и CCND2 представлены на рис. Для более четкой визуализации использованы инвертированные изображения.

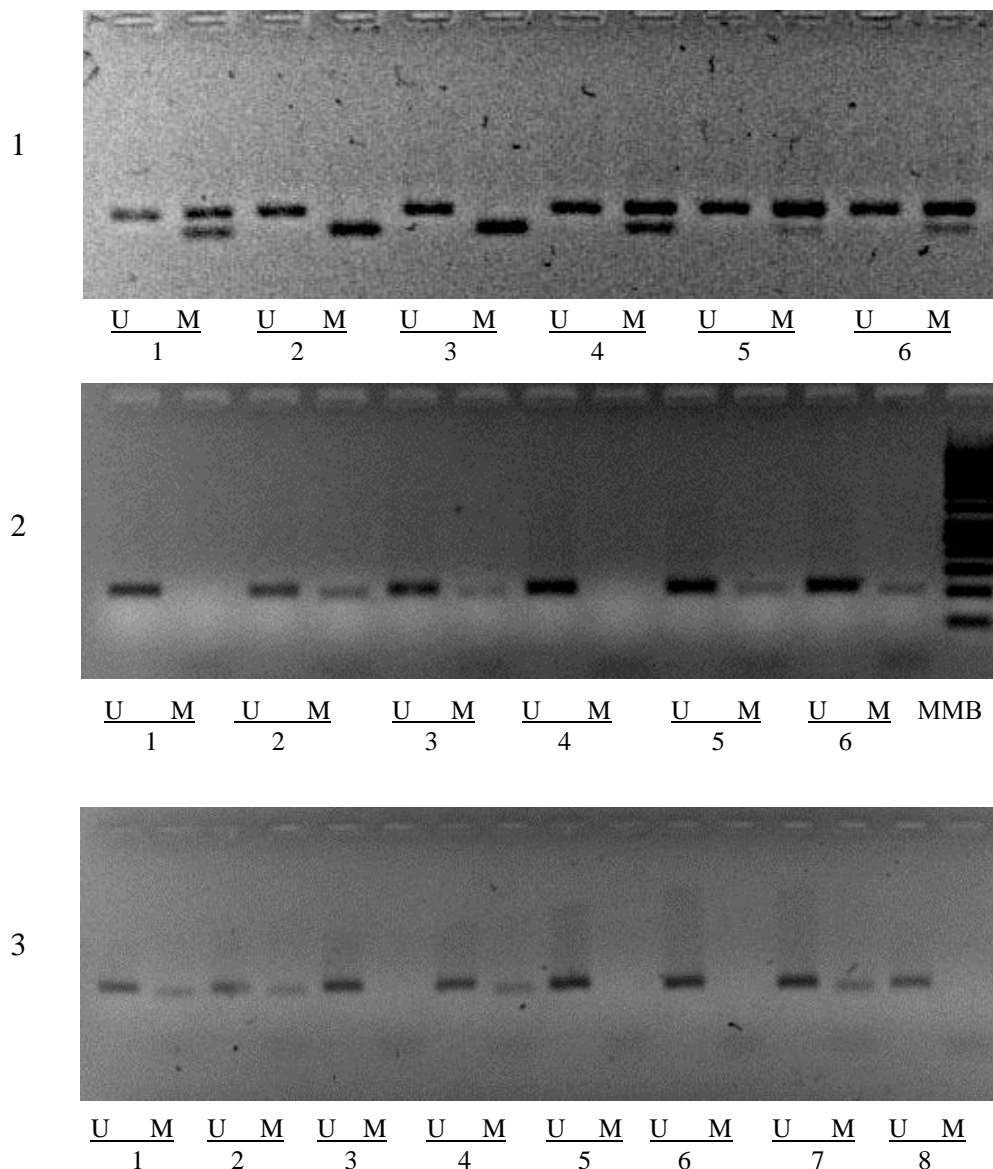


Рисунок — Результат электрофоретической детекции продуктов МС-ПЦР по генам GSTP1 (1), CCND2 (2) и APC (3): U — результат амплификации неметилированной ДНК; M — результат амплификации метилированной ДНК; MMB — маркер молекулярного веса

При анализе гиперметилирования результат тестирования неметилированной ДНК обычно является положительным и служит для контроля качества проведенной модификации ДНК. В случае присутствия в образце фрагментов анализируемых генов с метилированной последовательностью результат тестирования с использованием пары праймеров для метилированной ДНК также будет положительным (рис.).

При выявлении метилирования у двух любых (и более) генов из числа GSTP1, CCND2 и APC с высокой степенью значимости можно сделать заключение о злокачественном характере исследуемой патологии предстательной

железы. Чувствительность метода дифференциальной диагностики в этом случае составляет 79,5%, специфичность — 95,1%, а эффективность — 85,0%, соотношение шансов для наличия злокачественного процесса — OR=75,4 с уровнем значимости <0,001.

При выявлении одного и более метилированных генов чувствительность метода составляет 84,9%, специфичность — 70,7%, а при метилировании 3-х генов — 54,8 и 95,1% соответственно.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнения при проведении молекулярно-генетического анализа с использованием технологии МС-ПЦР могут проявляться в виде ложноположительных результатов. Это главным образом связано с неэффективной бисульфитной модификацией ДНК. Решение данной проблемы заключается в строгом соблюдении рекомендаций инструкции по применению используемого набора в части количества исходной ДНК, подвергаемой модификации. Превышение количества ДНК может привести к снижению эффективности модификации.