

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

05.03.2009 г.

Регистрационный № 135-1108

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АЛГОРИТМЫ ВЫЯВЛЕНИЯ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ И РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ
РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ**

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, д-р мед. наук В.Т. Кохнюк, М.Н. Клименков, А.С. Зеленкевич, А.Я. Суворов, Е.А. Мохонь, Т.И. Набебина

Минск 2009

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

РТК — рак толстой кишки
САП — семейный аденоматозный полипоз
APC — ген семейного аденоматозного полипоза
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ННРТК — наследственный неполипозный рак толстой кишки
MSI — микросателлитная нестабильность
ПЦР — полимеразная цепная реакция
K-ras — мутантный онкоген

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкция разработана с целью молекулярно-генетического выявления предрасположенности и ранней диагностики рака толстой кишки.

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

Уровень внедрения: лаборатории молекулярной онкогенетики специализированных онкологических центров, диспансеров, кабинеты генетического консультирования, ПЦР-лаборатории специализированных диагностических центров.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Перечень необходимого оборудования:

1. pH-метр.
2. Пипетки переменного объема.
3. Амплификатор.
4. Термостат.
5. Вортекс.
6. Горизонтальная камера для электрофореза.
7. Трансиллюминатор.
8. Молекулярный анализатор.
9. Микроцентрифуга с охлаждением.
10. Низкотемпературный морозильник (-70°C).

Реактивы и расходные материалы:

1. Набор реагентов для выделения ДНК.
2. Набор реагентов для определения мутации APC.
3. Праймеры для определения мутации K-ras.
4. Флуоресцентно-меченые праймеры для выявления микросателлитной нестабильности.
5. Рестриктаза BSTN1.
6. Буфер для рестриктазы BSA.
7. Taq-буфер.
8. Taq-полимераза.
9. dNTP.

10. Агарозный гель.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Семейный аденоматозный полипоз, наследственный неполипозный рак толстой кишки, семейно-отягощенный анамнез, рак толстой кишки.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Не выявлены.

АЛГОРИТМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ НА ФОНЕ СЕМЕЙНОГО АДЕНОМАТОЗНОГО ПОЛИПОЗА

Определение мутации 3920T>A (I1307K) в APC методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции

Материалом для исследования служили свежемороженые образцы полипов и опухолей, хранившиеся в низкотемпературном морозильнике (-70°C).

Геномную ДНК из образцов полипов и опухолей выделяли наборами «QIAamp DNA Blood Mini Kit», Qiagen (Германия) и «ДНК/РНК Сорб В» (Россия) в соответствии с инструкцией.

Аллель-специфическая ПЦР выполнялась в 4 этапа с использованием 2 мкл ДНК полипов толстой кишки или опухолевой ткани.

1. Этап амплификации

Реакционная смесь состояла из амплификационной смеси объемом 13 мкл и 5 ед. рекомбинантной Taq-полимеразы («Pronto»). ПЦР выполнялась на амплификаторе «iCycler Bio-Rad» по следующей программе:

- | | |
|---|-------------|
| <input type="checkbox"/> денатурация ДНК при температуре 94°C — 2 мин | } 35 циклов |
| <input type="checkbox"/> денатурация при температуре 94°C — 30 с | |
| <input type="checkbox"/> гибридизация при температуре 53°C — 30 с | |
| <input type="checkbox"/> элонгация при температуре 72°C — 30 с | |
| <input type="checkbox"/> при температуре 72°C — в течение 5 мин | |

После амплификации необходим контроль качества ДНК. Продукты амплификации (5–10 мкл) фракционировали в 2% агарозном геле с бромистым этидием в течение 30 мин при напряжении 120 В и визуализировали в УФ-свете.

2. Постамплификационный этап

К 5 мкл амплифицированной ДНК добавляли постамплификационную смесь, состоящую из 15 мкл Pronto-Buffer 5; 0,7 мкл Solution C и 0,5 мкл Solution D. Инкубация проходила в амплификаторе по протоколу:

- при температуре 37°C в течение 30 мин
- при температуре 95°C в течение 10 мин

3. Этап амплификации с праймерами

Для проведения амплификации с праймерами, по 8 мкл постаmplифицированной ДНК каждого образца добавляли в две лунки (красного и синего цвета). Этап амплификации в Pronto Plate проходил по следующему протоколу:

- денатурация ДНК при температуре 99°C — 15 с
 - денатурация при температуре 99°C — 30 с
 - гибридизация при температуре 60°C — 10 с
 - элонгация при температуре 72°C — 30 с
 - при температуре 18°C — в течение 1 мин
- } 20 циклов

4. Иммуноферментный этап

Полученные образцы переносили из Pronto Plate в Detection Plate с добавлением 100 мкл Assay Solution. После инкубации при комнатной температуре в течение 10 мин добавляли смесь из Conjugated HRP и Assay Solution. Инкубация проходила 10 мин при комнатной температуре. После каждой инкубации лунки отмывали 1×Wash solution 350 мкл. Для визуализации полученных результатов в каждую лунку вносили 100 мкл ТМВ-буфера и инкубировали в темном месте в течение 25 мин.

При проведении аллель-специфической ПЦР использовались праймерные стоки (96-луночный планшет). В каждой лунке содержатся 5'-меченный праймер и одиночные биотиновые нуклеотидные последовательности, комплементарные исследуемой ДНК. Каждый постаmplификационный образец тестировался в двух лунках на одну мутацию: в первой лунке определялся *мутантный аллель (mut)*, во второй лунке — *нормальный аллель (wt)*. В каждой лунке происходит связывание меченого биотином праймера с конъюгированным в лунке планшета стрептовидином с дальнейшей инкубацией с антителами, мечеными пероксидазой. Пероксидазная реакция проходит в условиях добавления ТМВ-субстрата.

Учет полученных результатов проводился визуально с оценкой голубого окрашивания или его отсутствия в двух лунках. В случае детекции только мутантного аллеля (mut) результат оценивался как гомозиготный генотип; При окрашивании двух аллелей (mut, wt) — как гетерозиготный генотип.

Этапы использования алгоритма молекулярно-генетического выявления предрасположенности развития рака толстой кишки на фоне семейного аденоматозного полипоза представлены в Приложении 1.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛГОРИТМА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ НА ФОНЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО НЕПОЛИПОЗНОГО РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ

Выявление уровня микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани по молекулярным маркерам D2S123, D17S250, D5S346, Vat-25 и Vat-26 методом капиллярного электрофореза

Материалом для исследования служили свежемороженые образцы опухолей толстой кишки. В качестве отрицательного контроля использовалась ДНК лимфоцитов периферической крови пациента.

Все образцы ткани опухоли и крови хранились в низкотемпературном морозильнике (-70°C).

1. Этап выделения ДНК

Геномную ДНК выделяли из опухолевой ткани и лимфоцитов периферической крови с помощью набора «QIAamp DNA Mini Kit» (Германия).

Фрагментный анализ методом капиллярного электрофореза выполнялся в 3 этапа с использованием 2 мкл ДНК опухолевой ткани толстой кишки.

2. Полимеразная цепная реакция

Общий объем ПЦР-смеси (для одного образца) составляет 25 мкл. В состав реакционной смеси входят: 1 μ l AmpliTaq Gold PCR буфер, 2,5 ммоль/л MgCl₂, 200 мкмоль/л каждого dNTP, 1,2U AmpliTaq DNA полимеразы, прямой и обратный праймеры в концентрации 0,8 мкмоль/л, 4–5 мкл ДНК образца, деионизированная бидистиллированная вода. Последовательность праймеров указана в табл. 1.

Таблица 1

Последовательность праймеров для микросателлитных маркеров Bethesda-панели

Маркер	Последовательность праймеров для микросателлитных последовательностей
D2S123	Forward: PET-5' AACAGGATGCCTGCCTTTA Reverse: 5' GGACTTCCACCTATGGGAC
D17S250	Forward:6-FAM- 5'GGAAGAATCAAATAGACAATReverse:5'GCTGGCCA TATATATATTTAAACC
D5S346	Forward: 6-FAM-5' ACTCACTCTAGTGATAAATCGGGReverse:5' AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT
Bat-25	Forward: NED-5' TCGCCTCCAAGAATGTAAGT Reverse: 5' TCTGCATTTTAACTATGGCTC
Bat-26	Forward: VIC-5' TGACTACTTTTGA CTTCAGCC Reverse: 5' AACCATTC AACATTTTAAACCC

ПЦР проводилась с использованием амплификатора PalmCycler (Corbett Research, Австралия) и IQCycler (BioRad, США) по следующему протоколу:

- активация AmpliTaq DNA-полимераза при температуре 94°C — 7 мин
- денатурация при температуре 94°C — 30 с
- отжиг праймеров (D2S123, D17S250, D5S346) при температуре 56°C — 45 с
- отжиг праймеров (Bat-25, Bat-26) при температуре 58°C — 30 с
- элонгация при температуре 72°C — 30 с

} 35 циклов

Для каждого опухолевого или нормального образца продукты ПЦР-реакции по всем маркерам Bethesda-панели смешивались в эквивалентном количестве. Выполнялась очистка смеси с использованием колонок SentiSpin 20 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции. Готовилась смесь для проведения фрагментного анализа на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США): на одну реакцию к 10 мкл формамида добавляли 1 мкл очищенной смеси ПЦР и 0,15 мкл стандарта GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems, США). Смесь денатурировали при 95°C в течение 2 мин, затем охлаждали при -20°C в течение 2 мин. В лунку планшета вносили по 10 мкл смеси, планшет с образцами для капиллярного электрофореза центрифугировали 1 мин при 2000 об./мин.

Фрагментный анализ осуществлялся при стандартных условиях, использовали капилляр 36-см 3130 Capillary Array, полимер 3130 POP-7™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems, США).

3. Микросателлитный анализ

Флуоресцентный сигнал от микросателлитной последовательности на электрофореграмме имеет вид доминантного пика, окруженного пиками меньшей интенсивности, так называемыми stutter-пиками, отстоящими друг от друга с шагом, соответствующим размеру повторяющегося элемента микросателлита (1 п.о. для моно-, 2 п.о. для динуклеотидных повторов). Ампликоны, соответствующие stutter-пикам на электрофореграмме, могут быть большего или меньшего размера доминантного пика, но более характерна меньшая длина данных пиков. Наличие stutter-пиков на электрофореграмме является характерным признаком сигналов от продуктов амплификации последовательностей, содержащих короткие повторяющиеся элементы между прямым и реверсным праймерами.

Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems, США). В программном обеспечении проводилась идентификация аллелей для каждого микросателлитного маркера в опухолевом и нормальном образцах пациента. Размеры и количество аллелей для каждого микросателлитного маркера сравнивались между нормальной и опухолевой тканью. При определении на электрофореграмме из образцов опухолевой ткани новых доминантных сигналов от микросателлитной последовательности относительно герминальных аллелей маркера, присутствующих в нормальной ткани пациента, такой результат для микросателлита рассматривался как микросателлитная нестабильность (microsatellite instability (MSI)).

Классификация по критерию MSI проводилась исходя из Рекомендаций Рабочей группы по микросателлитной нестабильности Национального института рака США с использованием Bethesda-панели, состоящей из 5 микросателлитных маркеров.

Опухоль имела высокий уровень микросателлитной нестабильности (MSI-High), если образец имел MSI, т.е. нестабильность числа коротких tandemных повторов в опухолевых клетках, выявляемую в 2 и более маркерах из Bethesda-панели.

Опухоль не имела микросателлитной нестабильности (MS-Stable), если ни один из маркеров не показывал варибельности по длине микросателлита при сравнении образцов опухолевой и нормальной ткани.

В группу с низким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-Low) относили образцы опухолевой ткани, в которых только в 1 из 5 тестируемых маркеров выявлялась MSI.

Этапы использования алгоритма молекулярно-генетического выявления предрасположенности к развитию рака толстой кишки на фоне наследственного неполипозного рака толстой кишки представлены в Приложении 2.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ РАННЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ

Определение мутаций гена K-ras методом полимеразной цепной реакции с рестрикцией эндонуклеазой

Материалом исследования служили свежзамороженные образцы полипов и опухолей толстой кишки. Все образцы ткани опухоли и полипов хранились в низкотемпературном морозильнике (-70°C).

Геномную ДНК из образцов опухолевых тканей и полипов выделяли с помощью наборов «QIAamp DNA Blood Mini Kit», Qiagen (Германия) и «ДНК/РНК Сорб В» (Россия) в соответствии с инструкцией.

В ходе REMS-ПЦР в реакционную смесь для проведения анализа вносились Taq-полимераза и рестрикционная эндонуклеаза (РЭ). Основными необходимыми условиями анализа являются термостабильность рестриктазы и ее способность быть активной в ПЦР-буфере. Поэтому важны рН раствора, ионная сила буфера, концентрация моновалентных катионов в растворе, концентрация ионов Mg^{2+} , присутствие дополнительных компонентов смеси.

Подбор условий проведения REMS-ПЦР осуществлялся при помощи функции температурного градиента амплификатора «PalmCycler» (Corbett Research, Австралия) и оптимизации состава ПЦР-смеси.

При проведении мультиплексной REMS-ПЦР использовались три пары праймеров:

Диагностические праймеры:

5BK1T 5'-TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT

3K2 5'-CGT CCA CAA AAT GAT TCT GA

Праймеры контроля прохождения ПЦР-реакции:

5BK38 5'-GTA CAC ATG AAG CCA TCG TAT A

3K39 5'-CCA CTT GTA CTA GTA TGC CTT AAG

Праймеры контроля рестрикции:

15BK36 5'-СТА GAA CAG TAG ACA CAA ACC A

3K37 5'-GAT TTT GCA GAA AAC AGA TC

REMS-ПЦР выполнялась с помощью 5 мкл (100–200 нг) ДНК, выделенной из образцов опухолевых тканей и полипов толстой кишки. Реакционная смесь объемом

25 мкл состояла из 0,5 мкл рекомбинантной Taq-полимеразы (Fermentas), 20 пкмоль каждого диагностического праймера, 20 пкмоль праймеров контроля прохождения ПЦР-реакции, 20 пкмоль праймеров контроля рестрикции, 0,5 мкл смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 0,5 мкл BSA, 2 мкл рестриктазы BstNI, 5 мкл Taq-буфера.

ПЦР выполнялась на амплификаторе «PalmCycler» (Corbett Research) по протоколу «Hot start PCR» с добавлением Taq-полимеразы при температуре 58°C:

- | | |
|---|-------------|
| <input type="checkbox"/> денатурация ДНК при температуре 94°C — 2 мин | } 30 циклов |
| <input type="checkbox"/> денатурация при температуре 92°C — 20 с | |
| <input type="checkbox"/> гибридизация при температуре 58°C — 1 мин | |

До проведения электрофореза реакционная смесь хранилась при 4°C.

Продукты ПЦР-реакции анализировались при помощи электрофореза в 2% агарозном геле на УФ-трансиллюминаторе «Biosom» (Россия). Результат учитывался и обрабатывался при помощи программного обеспечения «Vitran».

Все исследованные образцы содержали образец контрольного участка размером 214 пар оснований, свидетельствующий о том, что качество выделенной ДНК являлось удовлетворительным для проведения анализа. При наличии мутации K-ras в исследуемом образце содержался дополнительный участок ДНК (размером 81 пара нуклеотидов). Остальные образцы содержали только K-ras дикого типа.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Ошибочные результаты молекулярно-генетического исследования показателей могут быть получены при следующих ситуациях:

- использовании реагентов с истекшим сроком годности;
- неправильном хранении реагентов (особо критично для флуоресцентно-меченых праймеров);
- неточного пипетирования реагентов;
- неправильного приготовления реакционной смеси;
- работе с деградированной ДНК;
- потере продукта амплификации в ходе проведения очистки;
- нарушении технологии лабораторного тестирования (время инкубации, время амплификации, температурный режим и т. д.).



