

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть  
30 января 2009 г.  
Регистрационный № 157-1208

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ МАЖОРНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1,  
BRCA2, CHEK-2 И NBS1 ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И РАННЕЙ  
ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. К.У. Вильчук, канд. биол. наук К.А. Моссэ,  
Ю.Н. Леонович, А.В. Велиев, Т.В. Забавская

Минск 2009

В структуре онкологической заболеваемости среди женщин рак молочной железы (РМЖ) находится на первом месте и составляет 18–19% от всех злокачественных новообразований. При этом 5–10% пациентов имеют наследственную форму опухоли.

Успешное лечение заболевания зависит от возможностей его ранней диагностики. В связи с этим в настоящее время особенно актуальна разработка и внедрение эффективных методов прогнозирования и ранней диагностики с использованием молекулярно-генетических технологий. Молекулярно-генетический подход заключается в выявлении мутаций генов репарации, повышающих риск возникновения данной патологии.

Обследование 500 пациентов с РМЖ и яичников на наличие мутаций 5382insC и Cys61Gly (ген BRCA1), 6174delT (BRCA2), I157T и IVS2+1G>A (CHEK-2), 657del5 (NBS1) выявило высокую суммарную частоту мутаций в генах BRCA1 (5,5%) и CHEK-2 (8,5%), что свидетельствует о важности их тестирования для ранней диагностики. В то же время мутация 6174delT (BRCA2), достаточно широко распространенная в некоторых популяциях, в нашей стране встречается редко. То же касается и мутации 657del5, которая в гомозиготном состоянии является причиной развития синдрома Ниджмейгена.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Молекулярно-генетический анализ мутаций 5382insC и Cys61Gly (ген BRCA1), I157T и IVS2+1G>A (CHEK-2) может быть рекомендован:

- пациентам с впервые выявленным РМЖ и/или раком яичников в возрасте до 50 лет;
- пациентам с впервые выявленным РМЖ и/или раком яичников в любом возрасте при наличии аналогичного диагноза у двух и более родственников.

Анализ мутаций 6174delT (BRCA2), 657del5 (NBS1) может быть рекомендован пациентам с впервые выявленным РМЖ и/или раком яичников в любом возрасте при наличии аналогичного диагноза у двух и более родственников.

Анализ мутации 657del5 (NBS1) должен проводиться также при диагностике синдрома Ниджмейгена.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

#### **Принцип метода**

Для идентификации мутаций используется амплификация специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обычными или аллель-специфическими праймерами.

Анализ продуктов ПЦР проводится с помощью эндонуклеазной рестрикции с последующим разделением в полиакриламидных или агарозных гелях.

### **Биологический материал**

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови.

### **Идентификация мутаций 5382insC, Cys61Gly (ген BRCA1), 6174delT (ген BRCA2), I157T, IVS2+IG>A (ген CHEK-2), 657del5 (ген NBS1)**

#### **1. Перечень необходимого оборудования и реактивов**

##### **Полимеразная цепная реакция**

Материалы и оборудование: программируемый нагревательный блок (амплификатор), мини-центрифуга, пробирки объемом 1,5 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: Taq полимераза; соответствующий 10X буфер для ПЦР; 25мМ MgCl<sub>2</sub>; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); праймеры, фланкирующие участки ДНК, содержащие анализируемые мутации; бидистиллированная деионизированная вода.

Последовательность праймеров, используемых для идентификации мутаций, представлена в табл. 1.

Таблица 1

Последовательности праймеров

Ген	Мутация	Нуклеотидная последовательность
BRCA1	5382insC	BS9: 5'-GGGAATCCAAATTACACAGC BS10: 5'-CCAAAGCGAGCAAGAGAATCTC
	Cys61Gly	5iF: 5'-CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG 5iR: 5'-TTCCTACTGTGGTTGCTTCC
BRCA2	6174delT	6174delT(F): 5'-GTGGGATTTTTAGCCCAGCAAG BS20: 5'-CTGAGTTTACACAGTGCTCTGGG
CHEK2	I157T	CHEK2ARTF: 5'GCAGAAACACTTTCGGATTTCCGG
	IVS2+IG>A	CHEK2ARTR: 5'-CCACTGTGATCTTCTATGTCTGCA
NBS1	657del5	5'-CAGGACGGCAGGAAAGAAATCT-3' 5'-GGTACACAGAACATATTCAACTG-3'

#### **Рестрикция ПЦР-фрагментов специфическими эндонуклеазами**

Материалы и оборудование: термостат, мини-центрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: рестриктаза и соответствующий 10x буфер для рестрикции.

#### **Проведение электрофоретического разделения продуктов ПЦР**

Материалы и оборудование: камера для вертикального электрофореза, стекла соответствующего размера (15x15 см), прокладки и гребенка толщиной 0,8 мм, камера для горизонтального электрофореза, источник

постоянного тока, мини-центрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: бромфеноловый синий, ксиленцианол, 40% сахара, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, трис, ЭДТА, борная кислота, персульфат аммония, TEMED, маркер молекулярного веса bp50, bp100, H<sub>2</sub>O.

### **Окрашивание геля бромистым этидием**

Материалы и оборудование: кювета для окрашивания, трансиллюминатор, камера для фотографирования гелей.

Реактивы: бромистый этидий.

## **2. Методика определения мутаций**

### **ПЦР**

Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл (довести H<sub>2</sub>O) содержит 1xПЦР буфер, 1, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкM dNTP; по 1 мкM праймеров, 1 ЕД полимеразы.

1. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.

2. Пробирки поместить в амплификатор и провести первоначальную денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95 °С. Индивидуальные температурно-временные условия для каждой мутации представлены в табл. 2.

Таблица 2

### **Условия амплификации**

Мутация	Амплификационный цикл			Количество циклов
	денатурация	отжиг	синтез	
5382insC	95 °С, 45 с	60 °С, 45 с	72 °С, 45 с	36
Cys61Gly	95 °С, 45 с	62 °С, 45 с	72 °С, 45 с	30
6174delT	95 °С, 45 с	61 °С, 45 с	72 °С, 45 с	30
II57T	95 °С, 45 с	60 °С, 45 с	72 °С, 45 с	36
IVS2+1G>A				
657del5	95 °С, 45 с	62 °С, 45 с	72 °С, 45 с	30

На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 5 мин при 72 °С.

3. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

### **Рестрикция ПЦР-фрагментов специфическими эндонуклеазами**

К 9,4 мкл продукта ПЦР добавить 1,1 мкл десятикратного рестрикционного буфера и 0,5 мкл (5 Ед) рестриктазы. При проведении рестрикции двумя рестриктазами к 7,9 мкл продукта ПЦР добавить 1,1 мкл

десятикратного рестрикционного буфера и по 0,5 мкл (5 Ед) каждого фермента. Центрифугировать несколько секунд. Пробирки инкубировать в течение 12 ч при 37 °С. Специфические эндонуклеазы для анализа каждой мутации указаны в табл. 3.

Таблица 3

### Специфические эндонуклеазы

Мутация	5382insC	Cys61Gly	6174delT	I157T	IVS2+1G>A
Рестрикционная эндонуклеаза	DdeI	AvaII	PflMI, AluI	PstI	ScrFI

### Проведение электрофоретического разделения продуктов ПЦР

Приготовление растворов:

- 30% раствор полиакриламида (соотношение мономеров 29:1): 29 г акриламида, 1 г N,N'-метиленабисакриламида, H<sub>2</sub>O до 100 мл;
- 10X TBE буфер: 3,72 г ЭДТА, 27,5 г борной кислоты, 54 г триса, H<sub>2</sub>O до 500 мл;
- 20% персульфат аммония: 0,2 г персульфата, H<sub>2</sub>O до 1 мл;
- 6X буфер для нанесения проб: 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленианол, 40% (вес/объем) сахароза.

Метод:

1. Подготовить стекла электрофорезной камеры для заливки геля.
2. Приготовить гель.

Для приготовления 15 мл 10% геля с соотношением мономеров 29:1 смешивают 5 мл 30% полиакриламида, 1,5 мл 10X TBE, 9,5 мл H<sub>2</sub>O, 60 мкл 20% персульфата аммония, 20 мкл TEMED.

3. Раствор тщательно перемешать, быстро залить между стеклами и вставить гребенку. Оставить для полимеризации на 15–20 мин.

4. После полимеризации акриламида удалить гребенку и промыть образовавшиеся лунки 1X TBE.

5. Собрать камеру для электрофореза, заполнить резервуары 1X TBE.

6. В пробирки, содержащие ПЦР продукт, добавить 1/6 объема погружающего буфера.

7. В лунки геля микропипеткой нанести образцы. В крайние левую и правую лунки нанести маркер молекулярного веса.

8. Камеру подключить к источнику тока. Электрофоретическое разделение проводить при 320 В.

### Окрашивание геля бромистым этидием

После окончания электрофореза гель отделяют от стекол и помещают в кювету с раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Окрашивание проводят в течение 5–10 мин. Анализ и фотографирование электрофореграммы проводят в УФ-свете.

### Интерпретация полученных данных

Учет результатов анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК (табл. 4).

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

- в отрицательном контроле присутствуют полосы амплифицированной ДНК;
- в положительном контроле отсутствуют полосы, специфические для тестируемой мутации;
- в исследуемых образцах имеются неспецифические полосы различной величины.

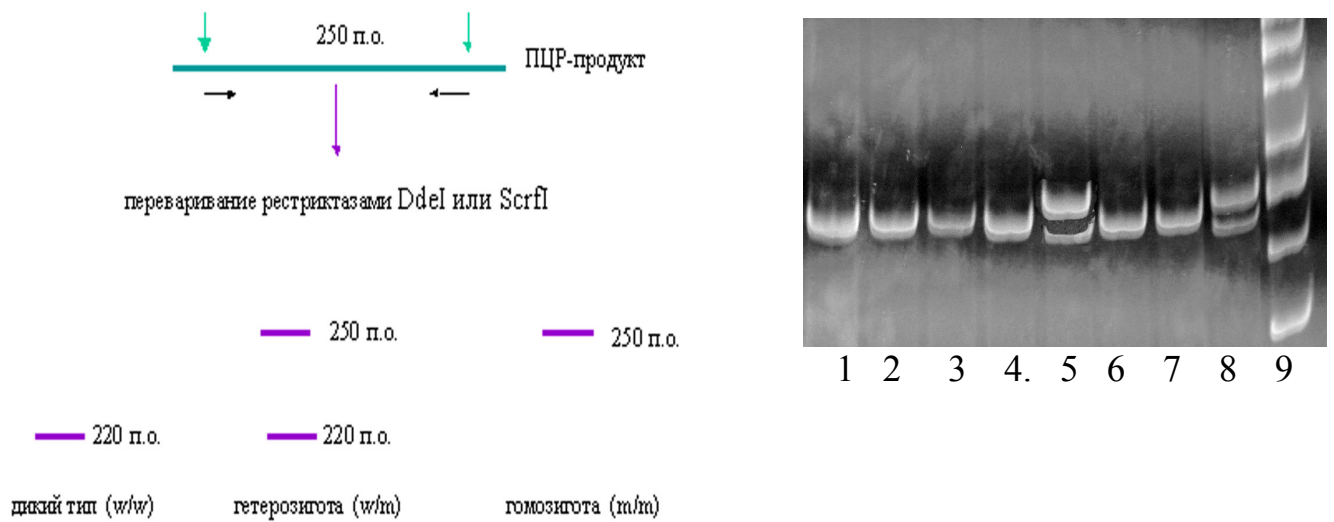
Таблица 4

Размер фрагментов ДНК наблюдаемых при анализе мутаций

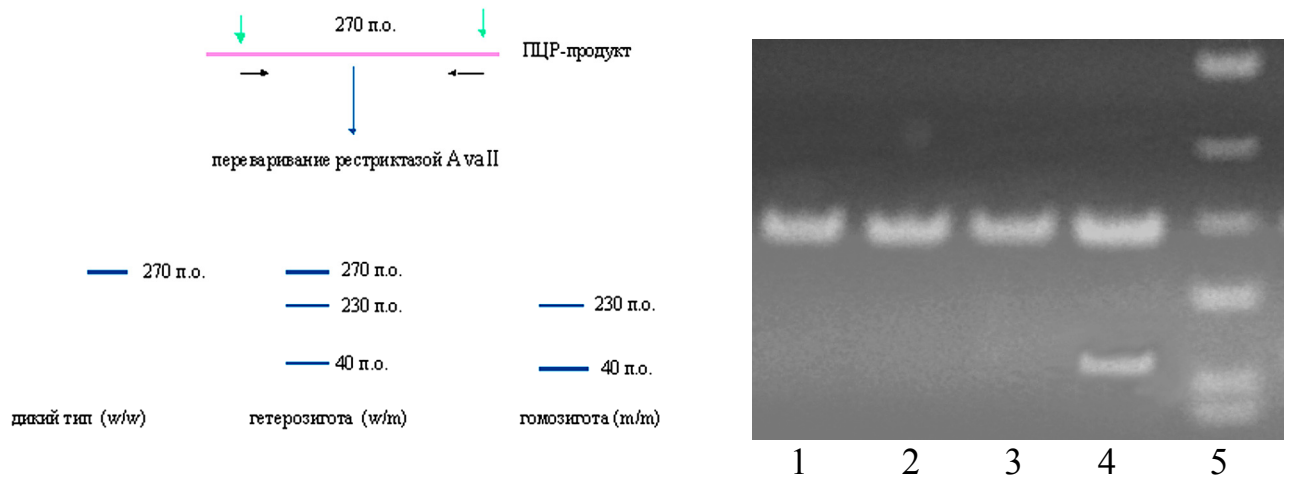
Мутация	Длина фрагментов ДНК (в парах нуклеотидов)		
	Норма	Гетерозиготное носительство	Гомозиготное носительство
5382insC	220	250 + 220	250
Cys61Gly	270	270 + 230 + 40	230 + 40
6174delT	290 + 190 + 30*	290 + 210 + 190 + 30	290 + 210
I157T	194	194 + 170	170
IVS2+1G>A	170	194 + 170	194
NBS1	351	391 + 351	391 + 351

\* — фрагменты менее 50 пар нуклеотидов могут быть не видны из-за высокой скорости миграции в геле.

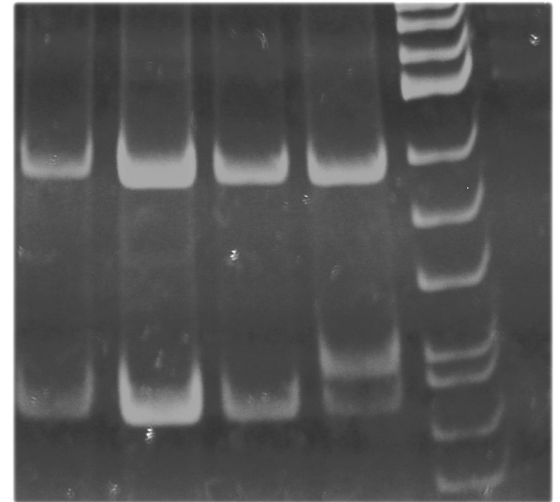
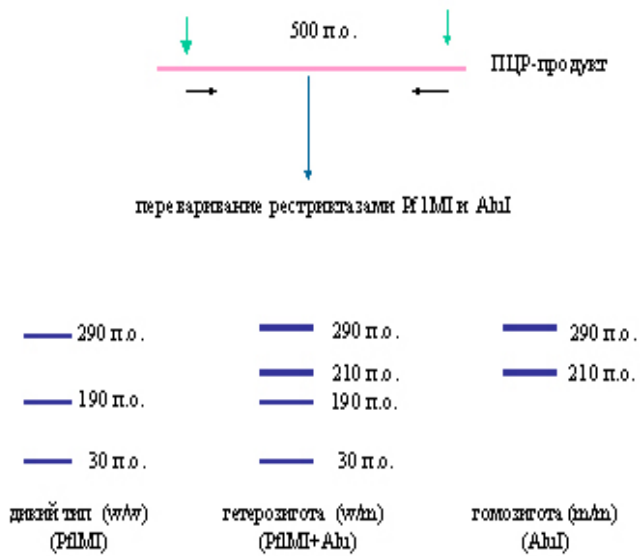
Интерпретацию результатов ДНК анализа проводили по схемам представленным на рис. 1–5.



**Рис. 1. Идентификация мутации 5382insC в гене BRCA1:**  
 1–4, 6, 7 — норма  
 5 — гетерозигота по сайту рестрикции DdeI (носитель мутации)  
 8 — положительный контроль  
 9 — маркер молекулярного веса

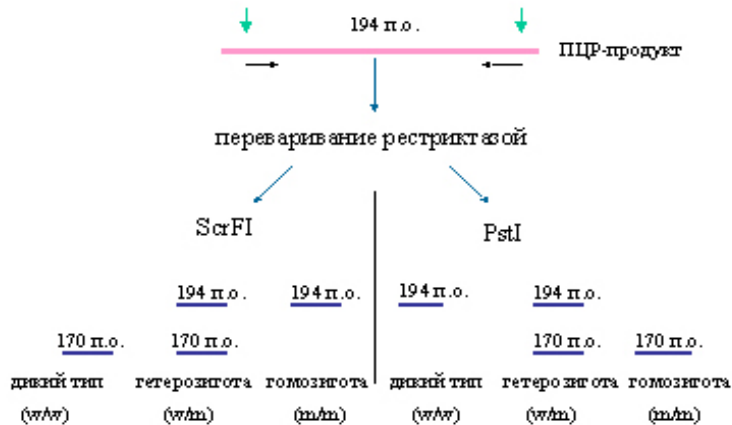


**Рис. 2. Идентификация мутации Cys61Gly в гене BRCA1:**  
 1–3 — норма  
 4 — положительный контроль (гетерозигота по сайту рестрикции AvaII)  
 5 — маркер молекулярного веса

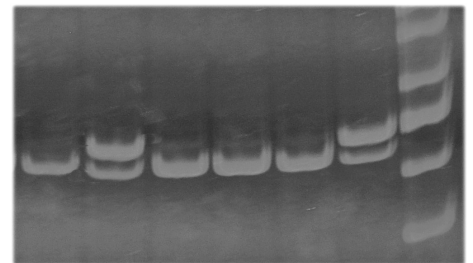


1 2 3 4 5

**Рис. 3. Идентификация мутации 617delT в гене BRCA2:**  
 1–3 — норма  
 4 — положительный контроль (гетерозигота по сайту рестрикции PflMI)  
 5 — маркер молекулярного веса

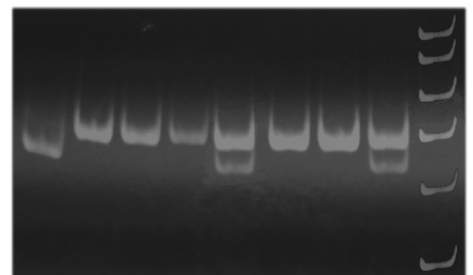


а



1 2 3 4 5 6 7

б



1 2 3 4 5 6 7 8 9

**Рис. 4. а. Идентификация мутаций IVS2+1G>A в гене CHEK-2:**  
 1, 3-5 — норма по мутации IVS2+1G>A  
 2 — гетерозигота по сайту рестрикции ScaFI  
 6 — положительный контроль  
 7 — маркер молекулярного веса



## б. Идентификация мутации I157T в гене СНЕК-2:

1 — гомозигота по сайту рестрикции PstI

2–4, 6, 7 — норма по мутации I157T

5 — гетерозигота по сайту рестрикции PstI

8 — положительный контроль

9 — маркер молекулярного веса

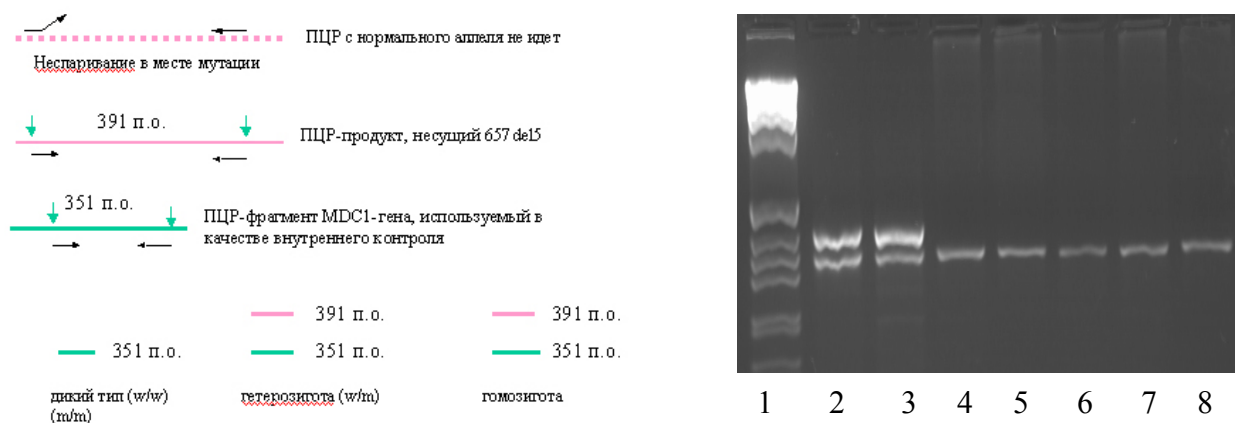


Рис. 5. Идентификация мутации 657delT в гене NBS1:

1 — маркер молекулярного веса

2 — положительный контроль

3 — носитель мутации

4–8 — не являются носителями

## ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Для предотвращения возможных диагностических ошибок требуется соблюдение следующих правил:

- использовать только химически чистую и, желательно, стерильную посуду;
- после работы с каждым объектом инструмент и используемые поверхности лабораторных столов протирать этанолом;
- использовать одноразовые пробирки и наконечники для пипеток;
- стерилизовать применяемые растворы (если допустима их стерилизация) и хранить их разлитыми небольшими порциями;
- работать только с минимально необходимыми объемами растворов;
- перед открыванием крышек пробирок осажать растворы со стенок центрифугированием;
- в каждую серию проб включать в качестве контроля пробирку с поэтапным внесением всех применяемых растворов, но без ДНК (отрицательный контроль);

- при выделении ДНК и постановке ПЦР лицо сотрудника должно быть защищено экраном либо маской, работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

В молекулярно-генетической лаборатории необходимо выделять несколько зон:

1. Зона экстрагирования ДНК — в ней осуществляют все этапы обработки биологического материала и выделения геномной ДНК.

2. Зона проведения ПЦР предназначена для внесения в пробирки компонентов амплификационной смеси и ДНК, а также для проведения амплификации.

В зонах экстрагирования ДНК и проведения ПЦР (первой и второй) не следует открывать пробирки с продуктами амплификации, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне.

3. Зона анализа продуктов ПЦР — в ней проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.