

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

6 августа 2004 г.

Регистрационный № 168–1203

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА И МОНИТОРИНГА
СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ДЛЯ СЕМЕЙ,
ПОЛУЧИВШИХ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ
ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ОБЛУЧЕНИЕ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: НИИ наследственных и врожденных заболеваний, НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова

Авторы: С.А. Красный, С.П. Фещенко, Н.В. Богданова, Е.С. Торбашевич

ВВЕДЕНИЕ

В современной лабораторной диагностике молекулярные методы исследований, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР) занимают особое место. ПЦР, или специфическая амплификация ДНК позволяет избирательно синтезировать *in vitro* относительно небольшие участки ДНК, длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар оснований, реже до 1000–2000 п. о. В качестве фермента, обеспечивающего синтез копий ДНК, используется термофильная ДНК-полимераза, выделенная из бактерий, живущих в горячих источниках и поэтому устойчивая к действию высоких температур.

Необходимым условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области ДНК, т.к. специфический выбор этого участка осуществляется путем гибридизации матричной ДНК с двумя искусственно синтезированными праймерами — олигонуклеотидными последовательностями ДНК длиной обычно от 15 до 30 п.о., комплементарными 3' концам амплифицируемого участка соответственно на смысловой и антисмысловой нитях ДНК. В качестве матрицы для синтеза может быть использован любой тип ДНК.

На первом этапе ПЦР исследуемая двухнитевая матричная ДНК переводится в одонитевую форму путем нагревания в течение нескольких минут до температуры 95–100° С. Дальнейшая схема проведения ПЦР достаточно проста и заключается в чередовании циклов:

- гибридизации, или отжига ДНК с праймерами;
- синтеза последовательности комплементарной матричной ДНК;
- денатурации образовавшихся двухнитевых структур.

При гибридизации, достигаемой за счет понижения температуры реакционной смеси до 30–60° С, происходит образование двухнитевого участка ДНК в строго специфических областях, комплементарных праймерам. При температуре, оптимальной для работы ДНК-полимеразы (60–72° С), начинается синтез ДНК в направлении 5'–3' с двухнитевого участка, образованного праймерами. Затем при

нагревании раствора примерно до 80–95° С синтез прекращается и двухнитевой участок между матричными и вновь синтезированными молекулами ДНК расплавляется (денатурирует). Каждая из процедур цикла определяется двумя параметрами: температурой реакции и ее длительностью (десятки секунд — 1–3 мин). ПЦР обычно проводят в автоматическом режиме, используя для этого специальные приборы — термоциклеры или амплификаторы ДНК.

Основными преимуществами ПЦР перед другими методами являются универсальность, высокая специфичность и чувствительность, быстрота получения результата, возможность доклинической и ретроспективной диагностики, а также возможность одновременного исследования нескольких генов. Кроме того, проведение анализа возможно при минимальном количестве ДНК в пробе. Универсальность методик ПЦР позволяет также использовать в качестве материала не только ДНК солидных тканей, но и ДНК биологических жидкостей.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. ДНК-диагностика спорадических форм рака и выявление мутаций генов предрасположенности к нему.
2. Выявление микрометастазирования, мониторинг рецидивов опухолей.
3. Доклиническая диагностика опухолей, прогноз течения заболевания и оценка эффективности назначаемой терапии.

Перечень необходимого оборудования: амплификатор, настольная центрифуга, термостат, реагенты, праймеры, рестриктазы (указаны в тексте), пипетки, пластиковая посуда для проведения ПЦР.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Методы выделения ДНК

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови

Выделение лейкоцитов из периферической крови:

1. Смешивают 5–10 мл цельной крови с равным объемом 2,6% раствора декстрана Т-500 в физиологическом растворе, хорошо пе-

ремешивают и оставляют при комнатной температуре на 45–60 мин до полного осаждения эритроцитов.

2. Надосадочную жидкость переносят в пластиковые центрифужные стаканы емкостью 50 мл и центрифугируют при 350 г в течение 20 мин.

3. Супернатант осторожно сливают, осадок ресуспендируют в 2 мл холодного физиологического раствора, затем доводят объем физиологическим раствором до 8 мл.

4. Проводят лизис эритроцитов добавлением 24 мл ледяной дистиллированной воды. Ингредиенты хорошо перемешивают и оставляют на 90 с.

5. Восстанавливают изотоничность добавлением 8 мл 3,6% раствора NaCl. Пробы снова центрифугируют при 350 г в течение 15 мин.

6. Осадок ресуспендируют в 2–5 мл физиологического раствора, переносят в пластиковые центрифужные пробирки емкостью 5 мл и центрифугируют при 2 000 г в течение 15 мин.

7. После удаления слоя мембран эритроцитов вместе с супернатантом к осадку добавляют 100 мкл дистиллированной воды и хранят до дальнейшего использования при -20°C .

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции:

1. К суспензии лейкоцитов добавляют 0,1 объема 10% SDS (додецилсульфат натрия) и протеиназу К до конечной концентрации 1 мг/мл.

2. Ингредиенты тщательно перемешивают и инкубируют либо ночь при 37°C , либо 2 ч при 56°C .

3. К смеси добавляют 0,5 объема фенола и 0,5 объема смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в пропорции 24:1. Компоненты медленно перемешивают путем переворачивания пробирок в течение 2 мин.

4. Центрифугируют в течение 1 мин при 10 000–12 000 об./мин.

5. Верхнюю фазу собирают в чистые пробирки, к ней добавляют 0,5 объема 7,5 М раствора ацетата аммония и 3 объема 96% этанола.

6. Видимый высокомолекулярный сгусток ДНК переносят в другую пробирку, промывают в 1 мл 70% этанола, этанол сливают, сушат ДНК и растворяют в 300 мкл дистиллированной воды.

7. Определяют спектрофотометрически концентрацию полученного водного раствора ДНК.

8. Водный раствор ДНК хранят до использования при -70°C (в случае необходимости водные растворы ДНК можно хранить при -20°C в течение нескольких месяцев).

Выделение ДНК из высушенных на бумаге пятен крови

Для постановки амплификации с пятен высушенной крови берут 15 мкл двухкратной амплификационной смеси, содержащей 10 ммоль Трис-НСI (рН 8,4), 50 ммоль КСI, 2,5 ммоль MgCl_2 , 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), по 200 мкмоль dATP, dGTP, dCTP и dTTP, 1 пмоль/мкл каждого праймера. Фрагмент пятна высушенной крови размером 1×1 мм помещают в пустую пробирку, вносят 500 мкл дистиллированной воды и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем удаляют жидкость пипеткой и еще раз вносят в пробирку 500 мкл дистиллированной воды. Инкубируют в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$, затем удаляют жидкость и переносят фрагмент пятна в амплификационную пробирку. Добавляют 15 мкл дистиллированной воды, наслаивают каплю минерального масла и инкубируют в течение 10 мин при 96°C . Затем охлаждают пробирку и добавляют в нее 15 мкл двухкратной амплификационной смеси.

Выделение ДНК из фиксированных формалином и заключенных в парафин солидных тканей

Депарафинирование срезов ткани:

1. В 1,5 мл центрифужные пробирки внести 10–20 парафиновых срезов толщиной 5–10 мкм.

2. В каждую пробирку с образцами добавить по 1 мл ксилола, закрыть и перемешивать при комнатной температуре в течение 30 мин.

3. Центрифугировать в течение 3–5 мин при 10 000–12 000 об./мин.

4. Слить супернатант.

5. Повторить шаги 1–3.

6. В каждую пробирку добавить по 0,5 мл 100% этанола, закрыть и перемешивать переверачиванием в течение 1–2 мин.

7. Центрифугировать в течение 3–5 мин при 10 000–12 000 об./мин.

8. Слить супернатант.

9. Повторить шаги 5–7.

10. Сушить образцы в вакууме до полного испарения этанола (до сушки поверх пробирок необходимо поместить Parafilm с порами для предотвращения загрязнения образцов). Можно также в каждую пробирку добавить 2–3 капли ацетона. Чтобы ускорить испарение ацетона, необходимо поместить открытые пробирки в термостат или на водяную баню (37–50° С).

Выделение ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции:

1. К депарафинированным образцам добавить 0,1 объема 10% SDS (додецилсульфат натрия) и протеиназу К до конечной концентрации 1 мг/мл.

2. Ингредиенты тщательно перемешать и инкубировать либо ночь при 37° С, либо 2 ч при 56° С.

3. К полученной смеси добавить 0,5 объема фенола и 0,5 объема смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в пропорции 24:1. Компоненты медленно перемешать путем переворачивания пробирок в течение 2 мин.

4. Центрифугировать в течение 1 мин при 10 000–12 000 об./мин.

5. Верхнюю фазу собрать в чистые пробирки, содержащие смесь хлороформа с изоамиловым спиртом в пропорции 24:1.

6. Центрифугировать в течение 1 мин при 10 000–12 000 об./мин.

7. Верхнюю фазу собрать в чистые пробирки, содержащие 0,5 объема 7,5 М раствора ацетата аммония и 3 объема 96% этанола.

8. Видимый высокомолекулярный сгусток ДНК перенести в другую пробирку, промыть в 1 мл 70% этанола, этанол слить, ДНК сушить и растворять в 300 мкл дистиллированной воды.

Выделение ДНК из амниотической жидкости методом фенольно-хлороформной экстракции

1. Амниотическую жидкость вносят в центрифужные пробирки объемом 15 мл и центрифугируют в течение 20 мин при 5 000 об./мин.

2. Клеточный осадок ресуспендируют в 200–400 мкл бидистиллированной воды и переносят в пробирки объемом 1,5 мл.

3. В каждую пробирку добавляют 0,1 объема 10% SDS (додецилсульфат натрия) и протеиназу К до конечной концентрации 1 мг/мл.

4. Ингредиенты тщательно перемешивают и инкубируют либо ночь при 37° С, либо 2 ч при 56° С.

5. К смеси добавляют 0,5 объема фенола и 0,5 объема смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в пропорции (24:1). Компоненты медленно перемешивают путем переворачивания пробирок в течение 2 мин.

6. Центрифугируют в течение 1 мин при 10 000–12 000 об./мин.

7. Верхнюю фазу собирают в чистые пробирки, к ней добавляют 0,5 объема 7,5 М раствора ацетата аммония и 3 объема 96% этанола.

8. Видимый высокомолекулярный сгусток ДНК переносят в другую пробирку, промывают в 1 мл 70% этанола, этанол сливают, высушивают ДНК и растворяют в 300 мкл дистиллированной воды.

9. Определяют спектрофотометрически концентрацию полученного водного раствора ДНК.

10. Водный раствор ДНК хранят при –70° С. В случае необходимости водные растворы ДНК можно хранить при –20° С в течение нескольких месяцев.

Выделение ДНК из образцов мочи

1. Образец мочи объемом 50 мл центрифугировать в течение 15 мин при 1,5 тыс. об./мин при 4° С.

2. Слить супернатант.

3. Полученный осадок ресуспендировать в 50 мл дистиллированной воды.

4. Центрифугировать в течение 15 мин при 1,5 тыс. об./мин при 4° С.

5. Повторить шаги 2 и 3 четыре раза (удаление солей).

6. Максимально удалить супернатант.

7. Полученный осадок ресуспендировать в 1 мл дистиллированной воды и перенести в пробирку Эппендорф.

8. Центрифугировать в течение 10 мин при 5 тыс. об./мин при 4° С.

9. Слить супернатант.

10. ДНК выделить, согласно стандартному протоколу фенольно-хлороформной экстракции (см. выше).

Электрофоретический анализ продуктов ПЩР

Электрофоретический анализ в агарозном геле

Для проведения электрофореза обычно применяют буферы с рН 7,5–8, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат. Обычно их готовят в качестве концентрированных растворов. Например, для приготовления пятикратного трис-бората (ТВЕ) на литр раствора необходимо 54 г триса, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА (рН 8,0).

Для исследования высокомолекулярной ДНК обычно готовят 0,8% агарозу, при анализе более коротких фрагментов используют гели агарозы с концентрацией достигающей 2%. Для визуализации фрагментов ДНК в агарозу добавляют бромистый этидиум.

Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле

Полиакриламидный гель (ПААГ) обычно используется для разделения фрагментов ДНК размером менее 1 000 п.о. В качестве примера для 5% геля объемом 100 мл, включающего 8 М мочевины приводим количество составляющих:

- 30% раствор мономеров (29 г акриамида и 1 г бисакриламида в 100 мл воды) — 16,6 мл;
- трис-боратный буфер (десятикратный) — 10 мл;
- мочевина — 48 г;
- вода дистиллированная — до 100 мл;
- ТЕМЭД — 25 мкл;
- свежеприготовленный 40% раствор персульфата аммония — 50 мкл.

После проведения электрофореза гели окрашивают бромистым этидиумом или нитратом серебра (см. ниже).

Окраска нитратом серебра ДНК-фрагментов в ПААГ

Метод окраски ДНК нитратом серебра более чувствителен, чем окраска бромистым этидиумом. Это особенно важно для одностиевой ДНК. Важно использовать воду высокого качества, так как все дополнительные ионы будут увеличивать неспецифику. Кроме того, гель необходимо переносить осторожно во избежание механических повреждений, что может повлиять на качество окраски. Все этапы, сопряженные с инкубацией, проводят на шейкере.

1. Гель переносят в стеклянную посуду.
2. Фиксация: 10% этанол, 5 мин (или больше). Если хранить гель, перед окраской нужно увеличить время фиксации, например, ночь, рекомендуется использовать 40% метанол.
3. Окисление: 1% азотная кислота, 3 мин.
4. Споласкивают дистиллированной водой 2 раза в течение нескольких секунд.
5. Серебряное окрашивание: 0,012 М нитрат серебра, 20 мин.
6. Промывают дистиллированной водой 2 раза в течение нескольких секунд (недостаточное промывание увеличивает неспецифику, в то же время слишком длительное промывание будет ослаблять окрашивающий сигнал).
7. Проявление: 0,28 М Na_2CO_3 безводный, 0,019% формалин. Добавляют часть проявителя, омывают гель и удаляют проявитель с осадком серебра, добавляют свежий проявитель. Когда будет достигнута желаемая интенсивность окраски, удаляют проявитель и останавливают проявление 10% уксусной кислотой (5 мин). Промывают гель дистиллированной водой.

Протокол ПЦР для выявления наиболее частых мутаций гена p53 у больных с гематурией и лиц, перенесших рак мочевого пузыря

Ген опухолевой супрессии p53 — один из наиболее часто мутирующих при онкологических заболеваниях. Мутации гена p53 могут быть вызваны как эндогенными, так и экзогенными факторами и обнаруживаются более чем в 50% исследованных опухолей. Такие новообразования характеризуются более высокой степенью злокачественности и, соответственно, тяжелее поддаются лечению. Мутации гена p53 в 90% случаев локализуются в так называемых «горячих точках» 5–9-го экзонов. Типы точечных мутаций гена p53 в различных тканях достаточно хорошо изучены, что позволяет использовать данный ген в качестве биомаркера на ранних стадиях развития опухолевого процесса. Выявление мутаций гена p53 в ДНК клеток эпителия мочевого пузыря — один из ранних маркеров рака этого органа.

Мутации гена p53 могут быть выявлены с помощью следующих ДНК-технологий:

1. Стандартная ПЦР с последующим электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов, которая позволяет выявить крупные делеции данного гена.

2. Секвенирование.

3. Оценка конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP) позволяет обнаружить дефекты гена без секвенирования. Однако при использовании SSCP устанавливается лишь факт наличия точечной мутации, а не ее характер. Тем не менее, SSCP-анализ после проведения обычной ПЦР часто является достаточным для ранней диагностики рецидивов опухоли.

4. Наряду с классической методикой ПЦР, для повышения чувствительности и специфичности может быть использована «гнездовая» ПЦР. Данная высокочувствительная модификация ПЦР особенно полезна для мониторинга мутантных генов в плазме крови и регионарных лимфоузлах.

5. Методы аллель-специфической ПЦР для выявления уже известной мутации гена.

В рамках данной инструкции мы приводим протокол одной из наиболее простых методик, но, как показано нами, высокоинформативной и требующей минимальных затрат реагентов.

Аллель-специфическая ПЦР (ARMAS-PCR)

1. Приготовить амплификационный буфер, содержащий 10 ммоль трис-НСl (рН 8,4), 50 ммоль КСl, 2,5 ммоль MgCl₂, 200 мкмоль dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 пмоль/мкл каждого праймера. Для ПЦР используется Taq-полимераза (Fermentas, Москва) и пары праймеров, представленные в табл. 1.

2. Амплификацию проводить в амплификационных пробирках, содержащих 17 мкл буфера и 1 мкг ДНК.

3. Поместить амплификационные пробирки с пробами в амплификатор «Perkin-Elmer» и провести начальную денатурацию ДНК при 100° С в течении 7 мин.

4. Внести в каждую пробирку по 1 ЕД Taq-полимеразы. Провести 35 циклов амплификации со следующими параметрами: денатурация — 94° С, 30 с; отжиг праймеров — 62° С, 20 с; элонгация — 62° С, 10 с.

5. Провести конечную элонгацию при температуре 72° С в течение 5 мин. Охлаждать пробирки до +4° С для остановки реакции.

6. Провести электрофоретический анализ ПЦР-продуктов в 0,8% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидиумом либо в 8% ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра.

7. Амплификацию проводить в амплификационных пробирках, содержащих 18 мкл рабочего раствора и 1 мкг ДНК (2 мкл ДНК).

8. Приготовить рабочий раствор, содержащий амплификационный буфер, 2,5 ммоль MgCl₂, 200 мкмоль dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) и 1 пмоль/мкл каждого праймера.

9. Поместить амплификационные пробирки с пробами в амплификатор «MJ Research». Внести в каждую пробирку по 1 ЕД Taq-полимеразы. Провести 35 циклов амплификации со следующими параметрами: денатурация — 94° С, 1 мин; отжиг праймеров — 1 мин при температуре 60° С для BRCA1, 61° С для BRCA2; элонгация — 72° С, 1 мин.

10. Затем провести конечную элонгацию при температуре 72° С в течение 5 мин. Охлаждать пробирки до +4° С для остановки реакции.

Таблица 1

Праймеры, примененные для проведения ARMAS-PCR

Нуклеотидная последовательность	Название праймера
GTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGTGGCA	A5MS («mutant specific» праймер)*
GTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCA	A5NS («wild-type» праймер)
CTCATAGGGCACCACCACACTATGTCG	A5NAS («wild-type» праймер)
GGCCTCCCCTGCTTGCCACAGGTCTCCCA	A7NS («wild-type» праймер)
CCAGTGTGATGATGGTGAGGATGGGCCTCC	A7NAS («wild-type» праймер)
CCAGTGTGATGATGGTGAGGAAGGGCCTCC	A7MAS («mutant specific» праймер)*
TACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGAGCA	A8MS («mutant specific» праймер)*
TACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCA	A8NS («wild-type» праймер)
CGCTTAGTGCTCCCTGGGGCAGCTCGT	A8NAS («wild-type» праймер)
TGGCTGGGAGAGGAGCTGGTGTGTTGGG	A9NAS («wild-type» праймер)
TGGCTGGGAGAGGAGCTGGTGTGTTGGA	A9MAS («mutant specific» праймер)*

*выделенный символ обозначает точечную мутацию гена p53, цифра в названии праймера — номер экзона

Протоколы ПЦР для выявления наиболее частых мутаций генов BRCA1 и BRCA2 при семейных и спорадических формах рака молочной железы

Для ПЦР была использована Taq-полимераза (Fermentas, Москва) и следующие пары праймеров (табл. 2):

Таблица 2

Использованные праймеры и рестриктазы

Название праймера (мутация)	Нуклеотидная последовательность праймера	Размер фрагмента	Рестриктазы
BRCA1 f 1(5382insC)	TCCAGTAGTCCTACTTTGAC	150 п.о.	DdeI
BRCA1 r1	ACCCCATATAGCACAGGTAC		
BRCA1 f2 (Cys61Gly)	TCTCTTATCCTGATGGGTTG	350 п.о.	AvaII
BRCA1 r2	GGAATCCAAATTACACAGC		
BRCA2 f2(6174delT)	AAGTGAAACCATGGATAAGGG	325 п.о.	AluI/PflmI
BRCA2r2	CACGGGAGGCAGAGGTTGCGG		

Протокол рестрикции

Для подтверждения наличия дефекта в геномной ДНК пациентов с раком молочной железы проводили рестрикцию амплифицированного фрагмента геномной ДНК.

Приготовить рестрикционный состав:

1. ПЦР-продукт — 6 мкл.
2. Рестрикционный раствор:
 - рестриктаза — 2 ед. реакт.;
 - буфер — до 9 мкл.

Инкубировать при температуре 37° С в течение ночи.

Наличие при электрофорезе продуктов рестрикции одного аллеля свидетельствует о гетерозиготном носительстве мутации, двух аллелей — о гомоготизации опухолевой клетки по мутантному аллелю.

Ошибки при выполнении методов могут быть связаны с загрязнением препарата ДНК либо со снижением активности фермента вследствие его хранения при плюсовой температуре.

Противопоказания к применению методов отсутствуют.