

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра  
Р.А.Часнойть

« 5 » 2009

Регистрационный № 147-1108

**ВЫЯВЛЕНИЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ  
К РАКУ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСРЕДСТВОМ  
ТЕСТИРОВАНИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ BRCA1 И BRCA2**

(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., Тропашко И.Б.,  
Воропаева А.В., Родько Д.Б.

Гомель 2009

Целью данной инструкции является описание технологического процесса выявления наиболее значимых для Беларуси наследуемых мутаций генов BRCA1 и BRCA2, определяющих высокий риск развития рака молочной железы (РМЖ). Данная технология может быть использована при молекулярно-генетическом тестировании наследственной предрасположенности к РМЖ в рамках работы областных кабинетов онкогенетического консультирования, а также для проведения генетического скрининга.

**Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники и др.**

В таблице 1 приведен оптимальный вариант набора оборудования для организации работ по тестированию мутаций генов BRCA1 и BRCA2.

Таблица 1 - Оптимальный набор оборудования

Наименование процесса/оборудования	Не-обходимое к-во
<i>Пробоподготовка</i>	
Высокоскоростная микроцентрифуга с ротором для пробирок типа «Eppendorf» 1,5 мл до 10 000 – 12 000×g.	1
Твердотельный термостат с функцией охлаждения до минус 10 <sup>0</sup> С	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл)	1
Насос с колбой-ловушкой	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Холодильник от +2 до +8 <sup>0</sup> С с морозильной камерой от -18 <sup>0</sup> С до -24 <sup>0</sup> С	1
Спектрофотометр для определения количества и качества выделенной ДНК	1
<i>Проведение ПЦР</i>	
Амплификатор ДНК	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл (2 шт); 20-200 мкл; 100-1000 мкл)	1
Твердотельный термостат с функцией охлаждения до минус 10 <sup>0</sup> С	1
Холодильник от +2 до +8 <sup>0</sup> С с температурой в морозильной камере не менее минус 16 <sup>0</sup> С	1

<i>Регистрация результатов амплификации</i>	
Источник питания с постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 600W/100mA/30W	1
Камера для горизонтального полиакриламидного гель-электрофореза	1
Комплект аксессуаров для изготовления полиакриламидных гелей	1
Жидкостной термоциркулятор для охлаждения рабочей поверхности электрофоретической камеры	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл; 100-1000 мкл)	1
Холодильник от +2 до +8 °С с температурой в морозильной камере не менее минус 16 °С	1

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 мл и 0,2 мл, стеклянная химическая посуда и др.

Основной набор реагентов для создания рабочих растворов, реакционных ПЦР-смесей и т.д. представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Набор реагентов для типирования мутаций генов BRCA1 и BRCA2 методом ПЦР с последующей электрофоретической детекцией

Наименование этапа/реагента	Назначение реагента	К-во на 1 исслед.
1	2	3
<i>Выделение и очистка образцов ДНК</i>		
Целесообразно использовать готовые коммерческие наборы соляной или сорбционной экстракции ДНК	Полный цикл выделения и очистки ДНК из образцов цельной венозной крови	1 набор – 50-500 выделений в зависимости от производителя
Примечание: Для наборов с соляной экстракцией потребуется дополнительная закупка изопропилового спирта и этилового спирта		
Проведение ПЦР из расчета проведения 1 реакции в объеме 25 мкл		
x10 ПЦР буферный р-р.	Содержит компоненты для создания оптимальных условий ПЦР	2,5 мкл

Продолжение таблицы 2

1	2	3
Термостабильный фермент ДНК-полимераза «горячего старта» (Hot Taq-полимераза)	Фермент, участвующий в репликации ДНК	0,5-1,0 ед. (0,1-0,2 мкл при концентрации 5 ед./мкл)
25 мМ MgCl <sub>2</sub>	Служит в качестве кофактора для ДНК-полимеразы	1,5-3,5 мкл
Смесь нуклеотидтрифосфатов НТФ (dNTP mix)	Мономер для синтеза цепи ДНК	0,5 мкл 10 мМ смеси
Олигонуклеотидные праймеры 10 мМ р-р	«Затравка» для начала синтеза исследуемого фрагмента ДНК	1 мкл каждого праймера
Образец ДНК 20-50 нг/мкл	Матрица для амплификации	1 мкл
Вода ПЦР-качества	Доведение реагентов до финальной концентрации	Доводится до объема 25 мкл
<i>Электрофоретическое фракционирование фрагментов ДНК после ПЦР из расчета на приготовления 1 полиакриламидного геля (ПААГ) для анализа 48 образцов и проведение электрофореза</i>		
Акриламид	Компонент ПААГ	3,328 г
Бис-акриламид	Компонент ПААГ	0,072 г
Тетраметилендиамин ТЕМЕД	Компонент ПААГ	0,020 мл
Персульфат аммония 40% р-р	Компонент ПААГ	0,020 г
Трис-(оксиметил)-аминометан	Компонент буферных растворов	0,646 г
Трицин	Компонент электродного буферного раствора	1,434 г
Уксусная кислота	Компонент гелевого и электродного буферных растворов	0,101 мл
ЭДТА	Компонент загрузочного буферного раствора	0,004 г
Бромфеноловый синий	Компонент загрузочного буферного раствора	0,00002 г
Глицерин	Компонент ПААГ	2,500 мл
Маркер молекулярного веса	Формирует шкалу сравнения для оценки молекулярного веса анализируемого фрагмента ДНК	2-5 мкл
<i>Окраска фрагментов ДНК с использованием нитрата серебра из расчета на 1 гель для анализа 48 образцов</i>		
Этиловый спирт	Компонент раствора для I этапа окраски	50 мл
Бензосульфат натрия	Компонент раствора для I и II этапа окраски	1,39 г
Нитрат серебра	Компонент раствора для II этапа окраски	0,4 г
Серная кислота (конц.)	Доведение pH растворов до оптимальных значений на I и II этапах окраски	0,5 мл

Карбонат натрия	Компонент раствора для IV этапа окраски	5,0 г
Тиосульфат натрия 2%	Компонент раствора для IV этапа окраски	0,4 мл
Формальдегид 37%	Компонент раствора для IV этапа окраски	0,4 мл
Уксусная кислота (конц.)	Компонент раствора для V этапа окраски	2,0 мл
Ацетат натрия	Компонент раствора для V этапа окраски	10,0 г
Глицерин	Компонент раствора для V этапа окраски	20,0 г
Дистиллированная и деионизированная вода	Используется для создания растворов и промывки геля на III этапе окраски	Около 1 л

### **Показания к применению**

- 1) наличие в семейном анамнезе двух и более случаев рака молочной железы и/или рака яичника;
- 2) возникновение заболевания до 45 лет;
- 3) первичномножественный опухолевый процесс;
- 4) генетический скрининг наследственной предрасположенности к развитию рака молочной железы.

### **Противопоказания для применения**

Не рекомендуется использовать в отношении лиц, не достигших совершеннолетия.

### **Описание технологии используемого метода**

#### **1 Материал для исследования**

Материалом для выделения ДНК с целью типирования мутаций генов BRCA1 и BRCA2 является цельная венозная кровь. Кровь для анализа объемом ~1000 мкл помещается в центрифужную пробирку 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5 М ЭДТА (финальная концентрация 50 мМ). Использование ЭДТА необходимо для предотвращения свертывания крови. Не рекомендуется для этих целей использовать гепарин, который ингибирует ПЦР. Хранение образцов крови производится в холодильной камере при 2-4<sup>0</sup>С не более 1 недели.

Для выделения ДНК предпочтительно использовать коммерческие наборы. Наиболее быстрая и экономическая методика предлагается разработчиками наборов, основанных на сорбционном методе выделения ДНК (например, «ДНК-Сорб-Б» ЦНИИЭ МЗ РФ). Данная методика позволяет получить из 100 мкл цельной крови около 40 мкл препарата ДНК, достаточного для 20-40 исследований. Этого количества вполне хватает для проведения первичного генетического анализа и его неоднократного повтора в случае необходимости.

Успешное проведение ПЦР в большой степени зависит от исходной концентрации анализируемой ДНК. Наиболее стабильные результаты получаются, когда ДНК вносится в количестве 20-50 нг в расчете на 1 мкл. Для этого концентрацию образцов выделенной ДНК необходимо измерять и приводить, в случае необходимости, в соответствие с вышеуказанной концентрацией. Для этих целей можно использовать специальные спектрофотометры для измерения концентрации ДНК/РНК, например, GenQuant Pro (GE) или NanoDrop (Thermo Scientific). При необходимости разбавление раствора ДНК осуществляется TE буфером.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при 2-8<sup>0</sup>С. Более длительное хранение производится при -20<sup>0</sup>С. Образцы ДНК лучше разделить на небольшие аликвоты, т.к частое размораживание-замораживание приводит к деградации ДНК.

## **2 Проведение полимеразной цепной реакции**

### **2.1 Специфические праймеры для детекции наиболее распространенных мутаций генов BRCA1 и BRCA2 методом ПЦР**

Генетический анализ включает в себя тестирование семи мутаций, локализованных в различных экзонах генов BRCA1 и BRCA2. Шесть из них локализованы в гене BRCA1 - 185delAG (экзон 2), 3819del5 и

3875del4 (экзон 11O), 2274insA (экзон 11G), 4153delA (экзон 11P) и 5382insC (экзон 20), а седьмая в гене BRCA2 - 6174delT (экзон 11).

Тестирование осуществляется методом гетеродуплексного анализа с использованием ПЦР. Анализ проводится по каждой из мутаций индивидуально. Для проведения ПЦР используются два специфических праймера (Forward и Revers).

Основные характеристики праймеров, применяемых для детекции мутаций генов BRCA1 и BRCA2 с использованием гетеродуплексного анализа, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Основные характеристики праймеров, используемых при типировании семи мутаций генов BRCA1 и BRCA2

Ген, экзон	Мутация	Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Молекулярный вес фрагмента
BRCA1 Экзон 2	185delAG	185-F	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	258 п.н.
		185-R	TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT	
BRCA1 Экзон 20	5382insC	5382-F	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	257 п.н.
		5382-R	AGTCTTACAAAATGAAGCGG	
BRCA1 Экзон 11O	3819del5 3875del4	11O-F	GAGTCCTAGCCCTTTCACCCATCA	289 п.н.
		11O-R	GTGATGTTCCCTGAGATGCCTTTG	
BRCA1 Экзон 11G	2274insA	11G-F	GCAACTGGAGCCAAGAAGAGTAAC	319 п.н.
		11G-R	CCTGAGTGCCATAATCAGTACCAGG	
BRCA1 Экзон 11P	4153delA	11P-F	CGTTGCTACCGAGTGTCTGTCTAAG	314 п.н.
		11P-R	AGCCCGTTCCTCTTTCTTCATC	
BRCA2 Экзон 11	6174delT	6174-F	CACCTTGTGATGTTAGTTTGGA	201 п.н.
		6174-R	TGGAAAAGACTTGCTTGGTACT	

В основу гетеродуплексного анализа положено свойство нитей ДНК в процессе отжига формировать, при наличии в смеси нормальной и мутантной формы, гетеродуплексы – результат гибридизации нормальной и мутантной ДНК. Гетеродуплексные структуры («норма»/«мутант») в геле мигрируют медленней соответствующих гомодуплексов («норма»/«норма» и «мутант»/«мутант»), и их пространственное расположение (паттерн) после электрофореза на геле является уникальным для конкретной мутации.

### **2.3 Условия проведения полимеразной цепной реакции**

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР буфер (200 мМ Трис-НСl рН 8,3, 200 мМ КСl, 50мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 мкл 10мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 3,5 мкл 25мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкл Hot Start Таq-полимеразы (5ед./мкл), 1 мкл образца ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. Обычно для проведения ПЦР более 8 образцов готовится общий раствор (master mix), в который входят все компоненты из расчета на количество исследуемых образцов. Образец ДНК вносится индивидуально в пробирки, содержащие смесь для ПЦР, в последнюю очередь. Для ПЦР используются специальные пробирки объемом 0,2 мл. Данный состав смеси рассчитан для амплификатора с подогреваемой крышкой и поэтому в ее составе отсутствует минеральное масло.

При каждой постановке ПЦР необходимо использовать положительный контроль в виде образца ДНК с искомой мутацией, который вносится в отдельную пробирку. Также необходимо использовать отрицательный контроль. Для этого в отдельную пробирку вносится смесь для проведения ПЦР, но не добавляется образец ДНК. Данная процедура позволяет

оценить чистоту смеси реагентов на предмет наличия в ней чужеродной ДНК, что дает возможность избежать ложноположительных результатов.

Аmplификация фрагмента экзона 20 BRCA1 (мутация 5382insC) проводится по следующей программе: начальная денатурация – 4 мин. при 94<sup>0</sup>С, затем 10 циклов 10-секундной денатурации при 92<sup>0</sup>С, отжиг - 20 сек. при 68<sup>0</sup>С и элонгация 20 сек. при 72<sup>0</sup>С при уменьшении температуры отжига на 1,5<sup>0</sup>С в каждом последующем цикле. Следующие 30 циклов – 10 сек. денатурация при 94<sup>0</sup>С, 30 сек. отжиг при 57<sup>0</sup>С и 30 сек. элонгация при 72<sup>0</sup>С. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72<sup>0</sup>С и охлаждение до 4<sup>0</sup>С.

Программа для амплификации фрагментов экзона 2 BRCA1 (мутация 185delAG) и 11 BRCA2 (мутация 6174delT) выглядит следующим образом: начальная денатурация – 4 мин. при 94<sup>0</sup>С, затем 35 циклов – 10 сек. денатурация при 94<sup>0</sup>С, 30 сек. отжиг при 59<sup>0</sup>С и 30 сек. элонгация при 72<sup>0</sup>С. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72<sup>0</sup>С и охлаждение до 4<sup>0</sup>С.

Аmplификацию трех фрагментов экзона 11 BRCA1 (мутации 3819del5, 3875del4, 2274insA и 4153delA) проводили по следующей программе: начальная денатурация – 4 мин. при 94<sup>0</sup>С, затем 35 циклов – 10 сек. денатурация при 94<sup>0</sup>С, 30 сек. отжиг при 55<sup>0</sup>С и 30 сек. элонгация при 72<sup>0</sup>С. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72<sup>0</sup>С и охлаждение до 4<sup>0</sup>С.

Следует подчеркнуть, что температуры отжига могут быть иными, если в исследовании использовать пары праймеров, отличающиеся по составу от вышеперечисленных.

Данные программы были апробированы на двух амплификаторах с подогреваемыми крышками от различных производителей - GeneAmp

2400 PCR System и Techne Genius Thermal Cyclers. Результаты амплификации не имели видимых различий.

### **3 Электрофоретическая детекция мутаций**

#### **3.1 Общие положения**

Принцип электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК основан на способности макромолекул мигрировать в постоянном электрическом поле от катода к аноду со скоростью, зависящей от их первичной структуры. Однородные фрагменты ДНК после амплификации будут мигрировать при электрофорезе совместно и представлять на электрофореграмме единую фракцию. При наличии в смеси фрагментов, различающихся первичной последовательностью, например, вследствие мутации, определенные условия электрофореза дают возможность выявить данные различия по изменению электрофоретической подвижности «мутантной» фракции по отношению к «нормальной». При этом наиболее важной составляющей подготовки и проведения электрофоретического фракционирования является подбор оптимальных условий электрофореза.

Для осуществления гетеродуплексного анализа наиболее оптимальным является горизонтальный полиакриламидный гель-электрофорез с последующей окраской нитратом серебра.

Ниже представленное описание процедуры подготовки и проведения электрофореза рассчитано для электрофоретической системы MultiPhorII (GE).

#### **3.2 Подготовка геля и буферных растворов**

Для приготовления геля и проведения электрофореза необходимо предварительно приготовить несколько растворов (Табл. 4).

Таблица 4 – Состав растворов для проведения полиакриламидного гелевого электрофореза

Раствор/компонент	К-во
<i>Акриламид:бис-акриламид (T = 30 %, C = 2 %)</i>	
акриламид	29,4 г
бис-акриламид	0,6 г
Вода дистиллированная и деионизированная (д/д)	до 100 мл
<i>Акриламид:бис-акриламид (T = 30 %, C = 3 %)</i>	
акриламид	29,1г
бис-акриламид	0,9 г
Вода (д/д)	до 100 мл
<i>Гелевый буфер 0,448 М Трис-ацетат pH 6,4 (4x концентр.)</i>	
Трис	5,4 г
Уксусная кислота (лед.)	до pH 6,4
Вода (д/д)	до 100 мл
<i>Анодный буфер 0,45 М Трис-ацетат pH 8,4</i>	
Трис	27,3 г
Вода (д/д)	400 мл
Уксусная кислота (лед.)	до pH 8,4
Вода (д/д)	до 500 мл
<i>Катодный буфер 0,08 М Трис/0,8 М Трицин</i>	
Трис	4,9 г
Трицин	71,7 г
Вода (д/д)	до 500 мл
<i>Раствор персульфата аммония (APS) 40%</i>	
Персульфат аммония	400 мг
Вода (д/д)	до 1 мл
<i>Загрузочный буфер</i>	
Гелевый буфер	3,0 мл
Бромфеноловый синий 1%	100 мкл
ЭДТА 0,2 М	250 мкл
Вода (д/д)	до 25 мл

Полиакриламидные гели для проведения электрофореза готовят на поддерживающей пленке типа GelBond PAG при помощи специального дополнительного набора аксессуаров (рис. 1) к электрофоретической системе MultiPhorII, включающего два стекла с прокладкой для формирования толщины геля и зажимы для скрепления стекол во время полимеризации.

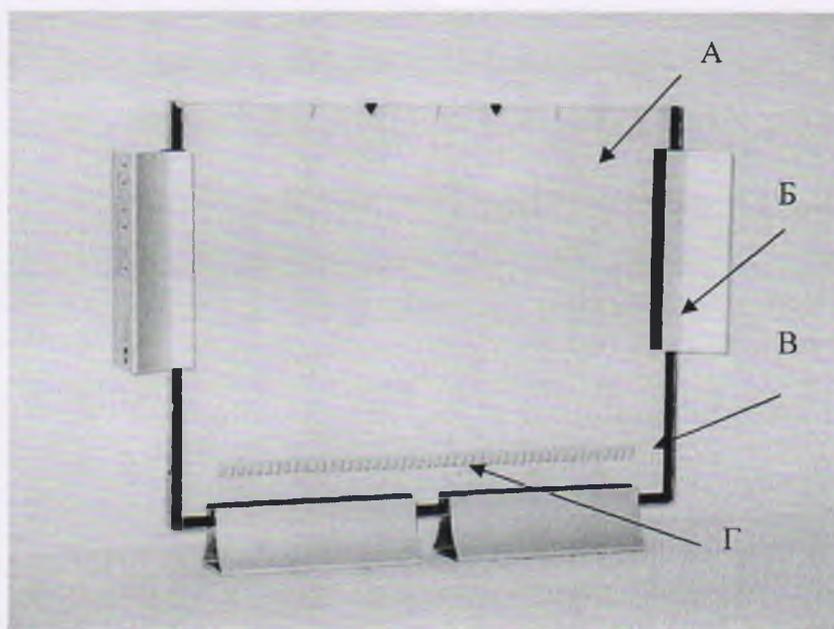


Рисунок 1 – Стенд для приготовления полиакриламидных гелей в собранном виде: А – стекла; Б – зажим для скрепления стекол во время полимеризации геля; В – прокладка уплотнительная, определяющая толщину геля; Г - наклейки для формирования загрузочных лунок

При помощи данного стенда готовят гель с размерами 25x14 см и 1 мм толщиной. Для приготовления одного геля используются компоненты в пропорциях, указанных в Таблице 5.

Концентрирующий гель заливается в первую очередь, а затем на концентрирующий гель наслаивается разделяющий гель. Стенд для приготовления геля рекомендуется предварительно охладить в холодильной камере. По истечении 2 часов после заливки гель готов к проведению электрофореза.

Таблица 5 – Состав реагентов для формирования одного полиакриламидного геля

Компоненты геля	Концентрирующий гель, T=4%, C=3%	Разделяющий гель, T=12%, C=2%
Глицерин	2,0 мл	0,5 мл
Акриламид:бис-Акриламид T=30%, C= 2%	-	10,0 мл
Акриламид:бис-Акриламид T=30%, C= 3%	1,3 мл	-
Гелевый буфер	2,5 мл	6,3 мл
Вода (д/д)	4,2 мл	8,3 мл
TEMED	6,0 мкл	14,0 мкл
APS 40% (добавляется непосредственно перед заливкой геля)	15,0 мкл	35,0 мкл

### 3.3 Проведение электрофоретического фракционирования

Перед электрофорезом продукты амплификации объемом 5 мкл тщательно смешивают с 2 мкл загрузочного буфера и вносят в загрузочные лунки геля пипеточным дозатором с индивидуальными наконечниками для каждого образца (рис. 2). Для оценки молекулярного веса анализируемых фрагментов в одну из свободных лунок вносится образец маркера молекулярного веса. Наиболее удобными являются маркеры с фрагментами от 50 до 800-1000 пар нуклеотидов с шагом в 50 пар нуклеотидов.

Для осуществления контакта электродов с гелем используются буферные полоски из трехслойной фильтровальной бумаги шириной 5 см, которые накладываются по всей ширине, захватывая 2 см геля с катодной и анодной стороны (рис. 2). Бумага пропитывается 15 мл соответствующего электродного буфера. После накладки электродов на буферные полоски электрофоретическая камера подсоединяется к источнику питания. Начальными параметрами тока для проведения электрофореза с использованием вышеописанного геля являются 600 В/100 мА/30 Вт. Электрофоретическое фракционирование осуществляется в течение 1 ч. 45 мин. при температуре рабочей поверхности камеры 15<sup>0</sup>С.

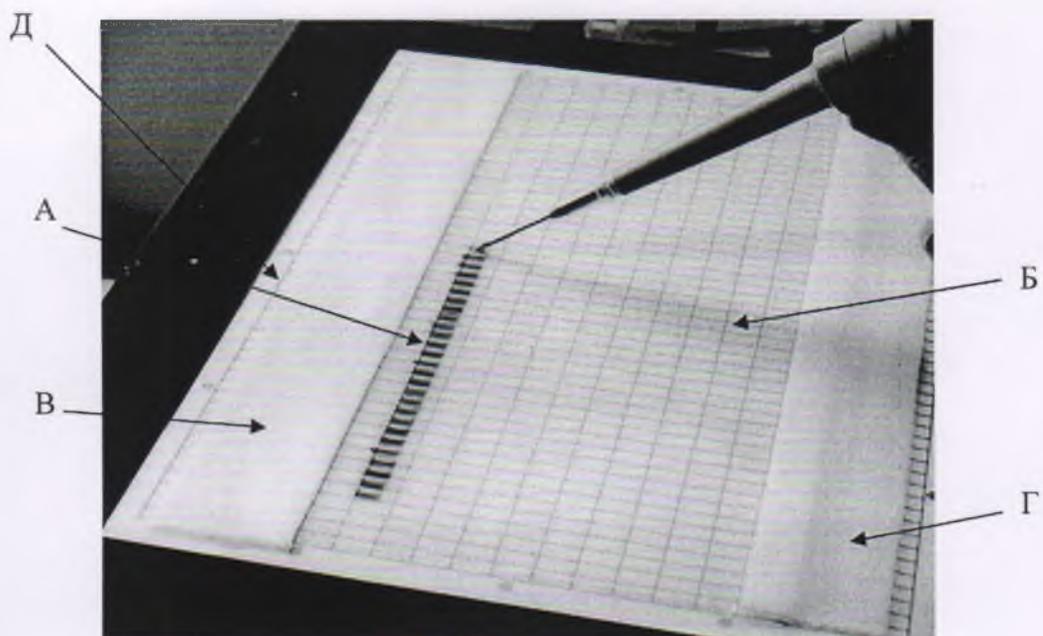


Рисунок 2 – Расположение геля в электрофоретической камере и нанесение образцов: А – лунки с образцами; Б – гель; В – катодная буферная полоска; Г - анодная буферная полоска; Д – охлаждаемая рабочая поверхность электрофоретической камеры с керамическим покрытием

Контроль процесса электрофореза осуществляется визуально по мере продвижения синей бромфеноловой метки от катода к аноду. Электрофорез прекращается, когда метка находится в 1 см от анодной буферной полоски.

### **3.4 Окраска геля с использованием нитрата серебра**

Окраска геля с использованием нитрата серебра может осуществляться как вручную, так и в специальной камере из комплекта MultiPhorII. Процесс окрашивания протекает в 5 этапов. Объем раствора для каждого из этапов составляет 200 мл. В таблице 6 представлены составы окрашивающих растворов и время инкубации геля на каждом из этапов.

Таблица 6 – Состав растворов и время инкубации на каждом из этапов окраски полиакриламидного геля с использованием нитрата серебра

Этап/раствор	К-во реагента/время
<i>I этап – Фиксирующий раствор</i>	
Натриевая соль сульфобензойной кислоты	1,25 г (0,7%)
Этиловый спирт	50 мл (24%)
Серная к-та (конц.)	0,5 мл (до pH 1,0)
Вода (д/д)	до 200 мл
Время инкубации	40 мин.
<i>II этап – Окрашивающий раствор</i>	
Нитрат серебра	0,4 г (0,2%)
Натриевая соль сульфобензойной кислоты	0,14 г (0,07%)
Вода (д/д)	до 200 мл
Время инкубации	40 мин.
<i>III этап – Промывка</i>	
Вода (д/д)	200
Время инкубации	2 мин.
<i>IV этап – Проявляющий раствор</i>	
Карбонат натрия	5 г (2,5%)
Формальдегид 37% (вносить непосредственно перед окраской)	0,4 мл (0,074%)
Тиосульфат натрия 2% (вносить непосредственно перед окраской)	0,4 мл (0,2%)
Вода (д/д)	до 200 мл
Время инкубации	5-7 мин. до появления четких фракций ДНК
<i>V этап – Остановка реакции и сохранение геля</i>	
Уксусная к-та (лед.)	2 мл (1%)
Ацетат натрия	10 г (5%)
Глицерин	20 г (10%)
Вода (д/д)	до 200 мл
Время инкубации	40 мин.

#### 4 Интерпретация результатов электрофоретического анализа

Идентификация мутаций после электрофореза и окраски осуществляется визуально по наличию дополнительных менее подвижных фракций ДНК. Примеры идентификации 7 мутаций генов BRCA1 и BRCA2 представлены на рисунке 3.

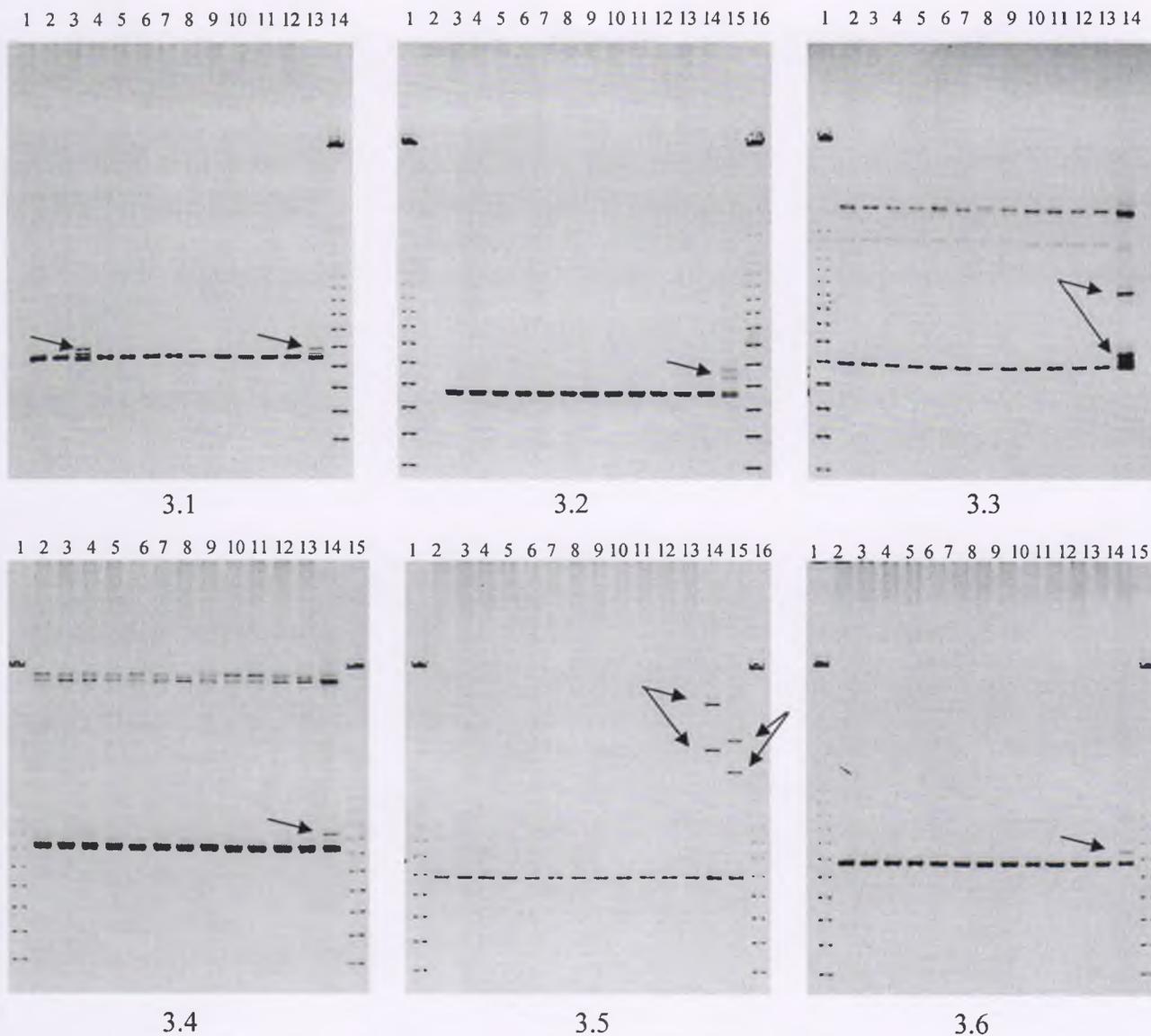


Рисунок 3 – Примеры электрофоретической идентификации 7 мутаций генов BRCA1 и BRCA2: 3.1 – мутация 5382insC (дорожка 3 и 13); 3.2 - мутация 6174delT (дорожка 15); 3.3 - мутация 185delAG (дорожка 14); 3.4 - мутация 2274insA (дорожка 14); 3.5 - мутация 3819del5 и 3875del4 (дорожки 14 и 15, соответственно); 3.6 - мутация 4153delA (дорожка 14); гетеродуплексные паттерны мутантных образцов указаны стрелками

## **5 Возможные ошибки при использовании метода ПЦР для тестирования мутаций генов BRCA1 и BRCA2**

Применение метода ПЦР требует строгого соблюдения соответствующих правил при организации и проведении всех этапов анализа в ПЦР-лаборатории. Отклонения от правил могут приводить к ошибкам, приводящим в конечном итоге к неверным - ложноотрицательным или ложноположительным заключениям. С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа. Это, прежде всего, ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб. Поскольку эти процедуры осуществляются вне ПЦР-лаборатории, большое внимание следует уделять обучению медицинского персонала, выполняющего забор проб, так как именно от него во многом зависит качество ПЦР-анализов. Сотрудники ПЦР-лаборатории должны неукоснительно соблюдать санитарные правила, разработанные для лабораторий, использующих метод ПЦР. Случаи тотальной контаминации выявляются без труда по появлению линии "положительной" ДНК во всех пробах, включая отрицательный контроль. Реагенты, загрязненные "положительной" ДНК, подлежат ликвидации. Повторная реакция ставится с новыми реагентами. Гораздо более сложно выявить случаи контаминации в отдельных пробах. Это можно сделать при проведении выделения ДНК и постановке реакции в 2-х или 3-х параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Эпизодические случаи появления линии "положительной" ДНК в отрицательном контроле свидетельствуют о возможности контаминации и в пробах.