

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневиц



_____ 2011

Регистрационный № 165-1110

**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ В ТКАНИ
МОЛОЧНОЙ 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., Родько Д.Б., к.м.н. Надыров Э.А.,
Мартыненко С.М., Тропашко И.Б., Силина А.А.

Гомель 2011

Целью данной инструкции является описание технологического процесса молекулярно-генетического анализа метилирования генов RAR β , HIN1, GSTP1, Cyclin D2 и APC, являющегося высокоспецифическим маркером злокачественного процесса молочной железы. Данная технология может быть использована для диагностики рака молочной железы с использованием в качестве материала ткани молочной железы, взятой посредством пункционной биопсии (ПБ).

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

В таблице 1 приведен оптимальный вариант набора оборудования для организации работ по тестированию метилирования генов RAR β , HIN1, GSTP1, Cyclin D2 и APC посредством метилспецифической полимеразной цепной реакции (МС-ПЦР) с последующей электрофоретической детекцией в агарозном геле.

Таблица 1 - Оптимальный набор оборудования

| Наименование процесса/оборудования | Необходимое 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 ⁰ 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 ⁰ С с морозильной камерой от -18 ⁰ С до -24 ⁰ 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 |

Продолжение таблицы 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 °С | 1 |
| Холодильник от +2 до +8 °С с температурой в морозильной камере не менее минус 16 °С | 1 |
| <i>Регистрация результатов амплификации</i> | |
| Источник питания с постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 200V | 1 |
| Камера для горизонтального агарозного гель-электрофореза | 1 |
| УФ-трансиллюминатор с фотокамерой для съемки в УФ свете | 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 экстракции ДНК и проведения полимеразной цепной реакции

| 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 солевой экстракции ДНК из ткани | Полный цикл выделения и очистки ДНК из образцов ткани | 1 набор – 50-500 выделений в зависимости от производителя |
| Примечание: Для некоторых наборов с солевой 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 ₂ | 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 |

Показания к применению

Уточнение диагноза при наличии в биопсийном материале новообразования молочной железы цитологических признаков атипии и дисплазии.

Противопоказания для применения

Отсутствуют.

Описание технологии используемого метода

1 Материал для исследования

Материалом для выделения ДНК с целью анализа метилирования является ткань молочной железы, взятая посредством ПБ. Процедура забора ткани осуществляется в процедурных кабинетах и может быть сопряжена с забором ткани для цитологического 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 -20⁰С.

Для выделения ДНК предпочтительно использовать коммерческие наборы. Наиболее быстрая и экономическая 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 коммерческие наборы для бисульфитной модификации. Предпочтительно использовать коммерческие наборы, использующие специальные колонки для модификации. Это позволяет получать высокопроизводительные результаты и сократить время процедуры.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при 2-8⁰С. Более длительное хранение производится при -20⁰С.

2 Проведение полимеразной цепной реакции

2.1 Специфические праймеры для анализа метилирования генов RARβ, HIN1, GSTP1, Cyclin D2 и APC методом МС-ПЦР

Для анализа метилирования используют две пары праймеров – для выявления неметилированной ДНК и для определения метилированной последовательности. Каждая пара праймеров используется в соответствующей независимой ПЦР. Нуклеотидная последовательность праймеров и основные параметры ПЦР представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Праймеры для анализа метилирования генов RARβ, HIN1, GSTP1, Cyclin D2 и APC и оптимальные условия проведения МС-ПЦР

| Ген | Название праймера | Последовательность нуклеотидов 5'-3' | Параметры ПЦР | |
|------|-------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | MgCl ₂ , мМ | T _{отж.} , °С |
| RARβ | RAR-U-F | GGATTGGGATGTTGAGAATGT | 2,0 | 60 |
| | RAR-U-R | CAACCAATCCAACCAAAACAA | | |
| | RAR-M-F | GAACGCGAGCGATTGAGT | | |
| | RAR-M-R | GACCAATCCAACCGAAACG | | |

Продолжение таблицы 3

| Ген | Название праймера | Последовательность нуклеотидов 5'-3' | Параметры ПЦР | |
|-----------|-------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | MgCl ₂ , мМ | T _{отж.} , °С |
| HIN1 | HIN-U-F | GGTATGGGTTTTTTATGGTTTGTT | 2,0 | 60 |
| | HIN-U-R | CAAAACTTCTTATACCCAATCCTCA | | |
| | HIN-M-F | GGTACGGGTTTTTTACGGTTCGTC | | |
| | HIN-M-R | AACTTCTTATACCCGATCCTCG | | |
| GSTP1 | MS-F | TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC | 2,5 | 59 |
| | MS-R | GCCCCAATACTAAATCACGACG | | |
| | UMS-F | GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT | | |
| | UMS-K | CCACCCAATACTAAATCACAACA | | |
| Cyclin D2 | D2UM-F | AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT | 2,5 | 56 |
| | D2UM-R | ACATCCTCACCAACCCTCCA | | |
| | D2M-F | GGCGGATTTTATCGTAGTCG | | |
| | D2M-R | CTCCACGCTCGATCCTTCG | | |
| APC | APCUM-F | GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT | 2,5 | 61 |
| | APCUM-R | CCAATCAACAAACTCCCAACAA | | |
| | APCM-F | TATTGCGGAGTGCGGGTC | | |
| | APCM-R | TCGACGAACTCCCGACGA | | |

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 мМ Трис-НСl рН 8,3, 200 мМ КСl, 50мМ (NH₄)₂SO₄), 1 мкл 10мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 2,0-2,5 мкл 25мМ MgCl₂ (табл. 3), 0,1 мкл Hot Start Таq-полимеразы (5ед./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 95⁰С, затем 35 циклов 30-секундной денатурации при 94⁰С, отжиг праймеров - 30 сек. при температуре 56-61⁰С (см. таблицу 3) и элонгация 30 сек. при 72⁰С. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72⁰С и охлаждение до 4⁰С.

3 Электрофоретическая детекция результатов МС-ПЦР

3.1 Подготовка геля и буферных растворов

Детекция результатов амплификации осуществляется посредством агарозного гель-электрофореза и окраской бромистым этидием в электрофоретической камере для горизонтального агарозного гель-электрофореза. Ниже представленное описание процедуры подготовки и проведения электрофореза рассчитано для стандартной электрофоретической системы. Ее схематическое изображение представлено на рисунке 1.

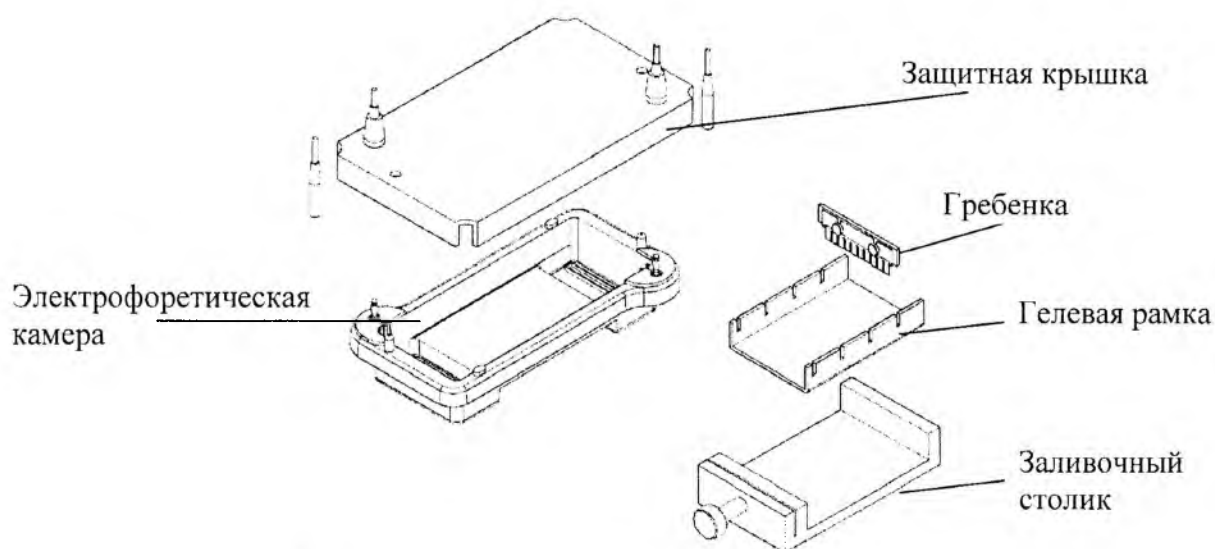


Рисунок 1 – Схематическое изображение электрофоретической камеры для агарозного гель-электрофореза

Для проведения электрофоретического анализа необходимо приготовить четыре основных раствора реагентов для проведения электрофореза. Для удобства использования изначально готовят концентрированные (стоковые) растворы, из которых затем путем добавления дистиллированной и деионизированной воды формируют рабочие растворы.

1. Подготовка стокового раствора 0,5M EDTA, pH = 8,0

| Реагенты | Конц. | 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 pH. Поэтому при растворении нужно добавлять щелочь понемногу и контролировать pH. Хранить раствор при 4°C.

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

| Реагенты | Конц. 1× | Конц. 20× | Сток | На 500 мл |
|-------------------|----------|-----------|------------|-----------|
| Трис | 89 мМ | 1,78 М | 121,14 г/М | 107,8 г |
| Борная кислота | 89 мМ | 1,78 М | 61,83 г/М | 55,03 г |
| EDTA 0,5M, pH 8.0 | 2 мМ | 40 мМ | 500 мМ | 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 литр 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 | Конц. | 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 выглядит следующим образом:

1. Подготовить форму для заливки геля, герметично закрепив гелевую рамку в заливочном столике.

2. 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.

3. Залить расплавленную агарозу в собранную форму. Установить гребенки в специальные пазы на кювете так, чтобы гребенки не доставали до дна кюветы около 1 мм.

4. Оставить гель на 30 мин для полимеризации. После полного застывания геля аккуратно извлечь гребенки, не повреждая лунки. Поместить кювету с гелем в камеру для электрофореза, сориентировав гель лунками ближе к отрицательному электроду (катоду). Залить в камеру для электрофореза рабочий раствор 1× ТБЕ буфера так, чтобы слой буфера на 5 мм покрывал гель.

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

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

7. Закрыть электрофоретическую камеру защитной крышкой.

8. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания, соблюдая полярность подключения.

9. Электрофорез проводить при напряжении 10–15 В/см.

В нашем случае установка начальных параметров тока в источнике питания должны соответствовать 40 Вт, 170 В, 400 мА. Электрофорез проводить в течение 25-30 минут.

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 RAR β , HIN1, GSTP1, Cyclin D2 и APC представлены на рисунках 2-6. Для более четкой визуализации использованы инвертированные изображения.

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. 2-6).

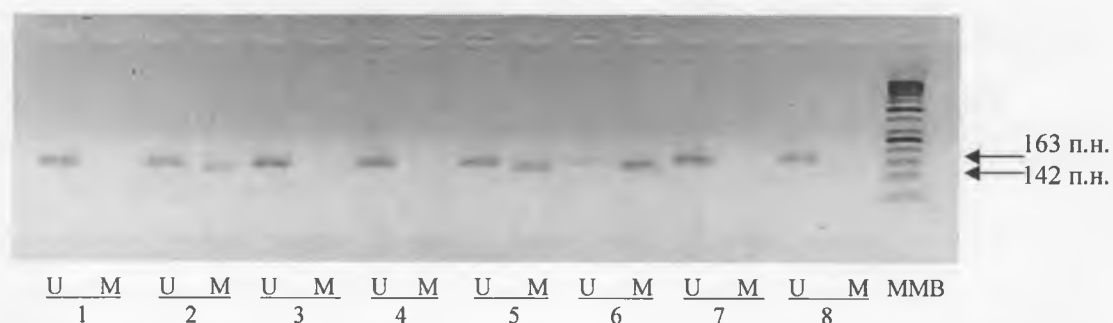


Рисунок 2 – Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену RAR β . U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК, MMB – маркер молекулярного веса

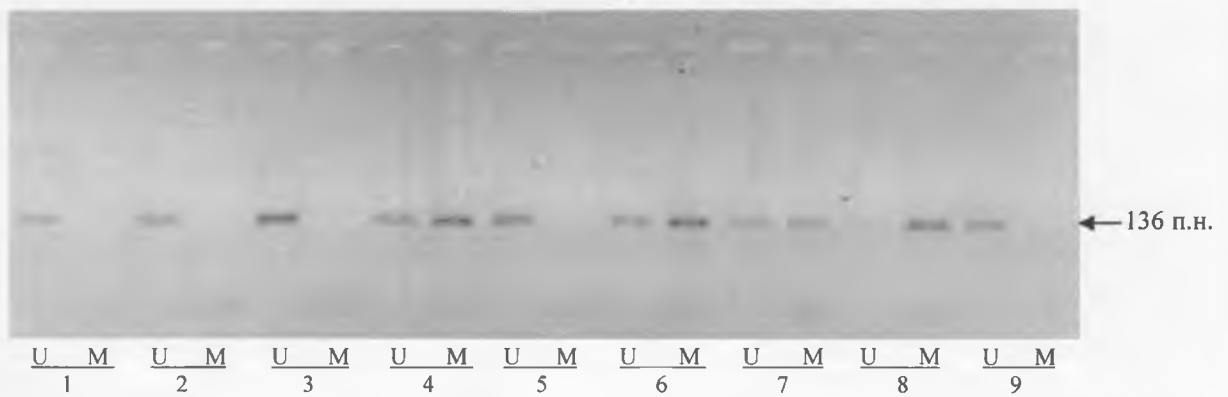


Рисунок 3 - Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену HIN-1. U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК

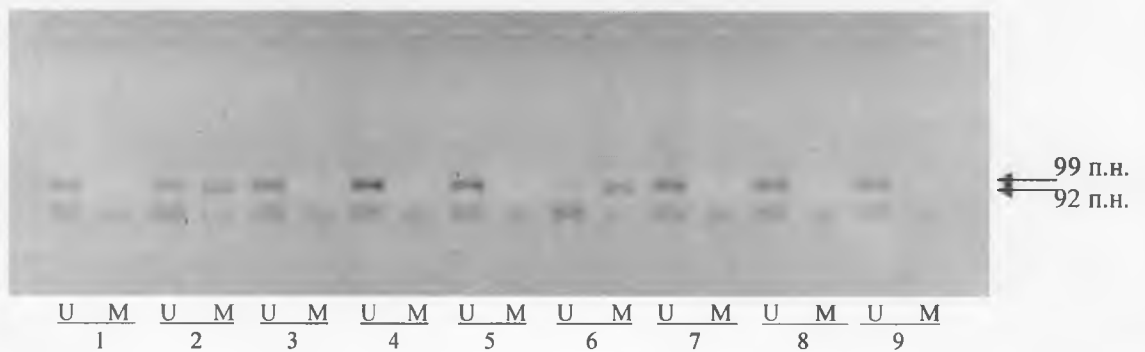


Рисунок 4 - Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену GSTP1. U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК

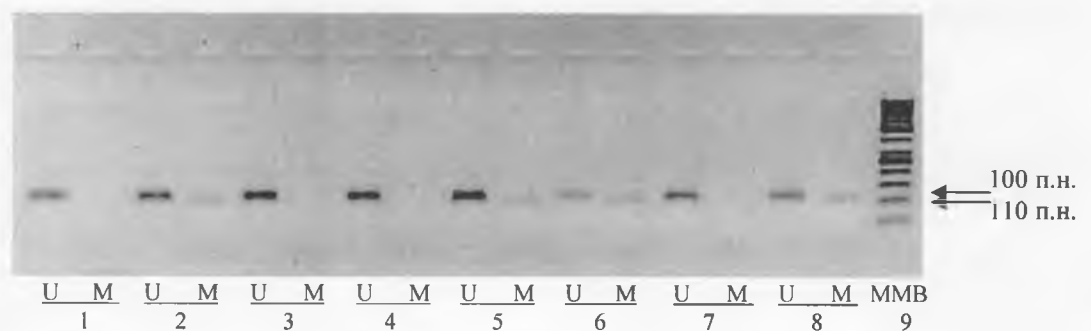


Рисунок 5 - Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену APC. U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК, MMB – маркер молекулярного веса

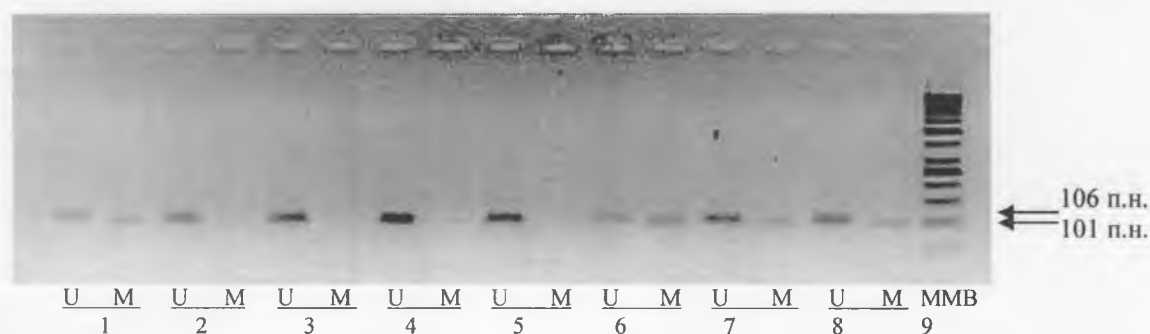


Рисунок 6 - Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену Cyclin D2. U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК, ММВ – маркер молекулярного веса

В соответствии с результатами проведенных исследований в группах пациенток с диагнозом «рак молочной железы» и пациенток с различными доброкачественными патологиями молочной железы, метилирование по одному из генов - GSTP1 или RAR β – может свидетельствовать о злокачественном процессе в анализируемой ткани молочной железы. Также отражением злокачественной трансформации клеток молочной железы является метилирование одновременно двух и более генов из числа используемых для анализа - RAR β , HIN1, GSTP1, Cyclin D2, APC.

3.4 Обезвреживание реагентов после проведения электрофореза

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4–6 ч. Затем добавляют 1 объем 2,5М гидроксида натрия и аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.