

**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 $\beta$ , 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 $\beta$ , 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 <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

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 <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

### 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 -20<sup>0</sup>С.

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 2-8<sup>0</sup>С. Более длительное хранение производится при -20<sup>0</sup>С.

## 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 <sub>2</sub> , мМ	T <sub>отж.</sub> , °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 <sub>2</sub> , мМ	T <sub>отж.</sub> , °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	CCAATCAACAACCTCCCAACAA		
	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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 мкл 10мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 2,0-2,5 мкл 25мМ MgCl<sub>2</sub> (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 95<sup>0</sup>С, затем 35 циклов 30-секундной денатурации при 94<sup>0</sup>С, отжиг праймеров - 30 сек. при температуре 56-61<sup>0</sup>С (см. таблицу 3) и элонгация 30 сек. 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.

### 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.

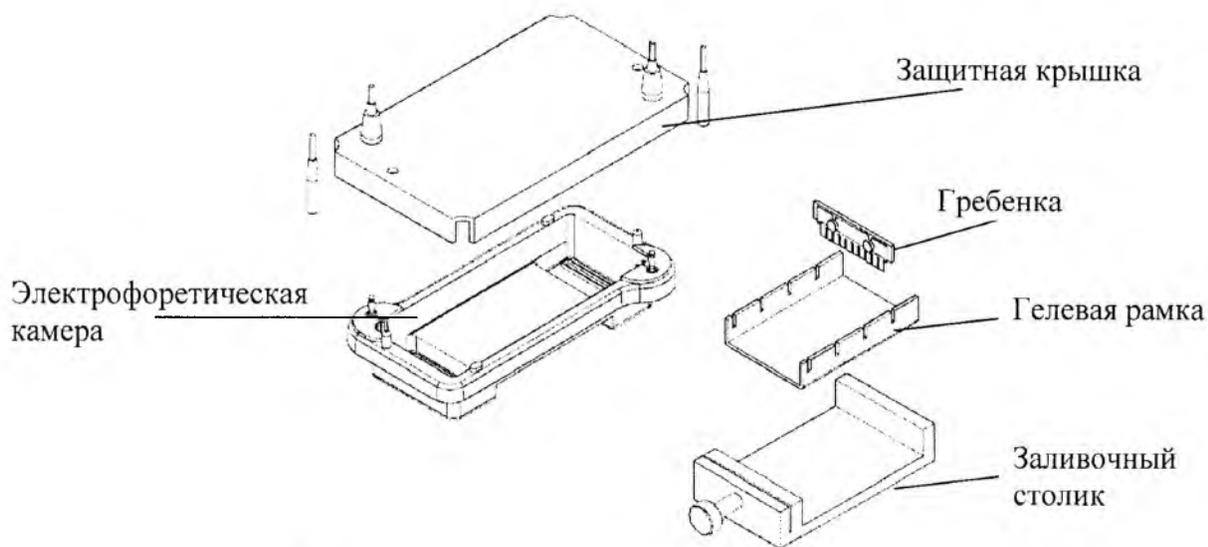


Рисунок 1 – Схематическое изображение электрофоретической камеры для агарозного гель-электрофореза

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 M	18,62 г
NaOH	~0,5 M	2,028 г
H <sub>2</sub> 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 mM	1,78 M	121,14 г/М	107,8 г
Борная кислота	89 mM	1,78 M	61,83 г/М	55,03 г
EDTA 0,5M, pH 8.0	2 mM	40 mM	500 mM	40 мл
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 $\beta$ , 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).

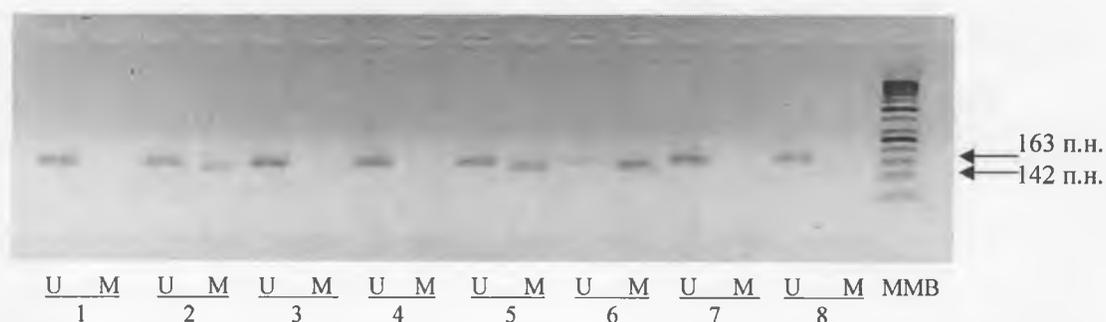


Рисунок 2 – Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену RAR $\beta$ . U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК, MMB – маркер молекулярного веса

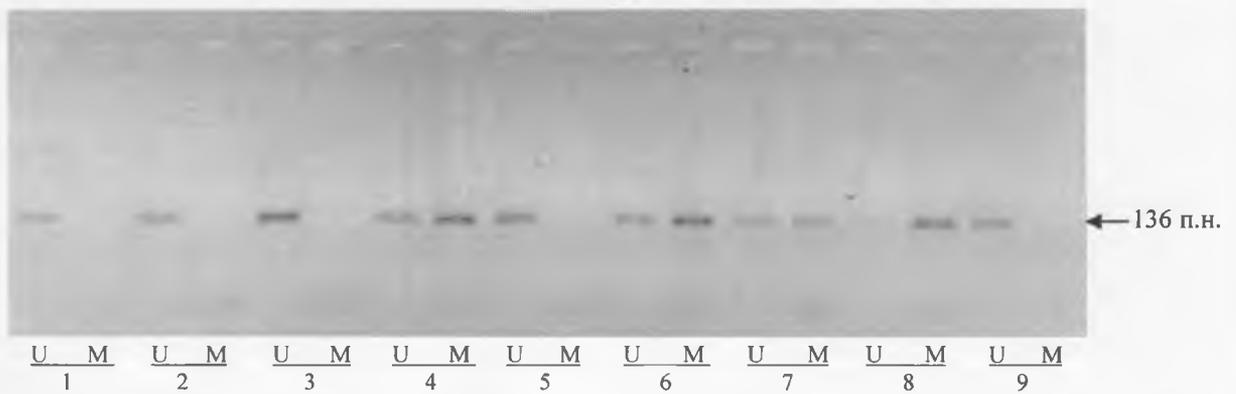


Рисунок 3 - Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену HIN-1. U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК

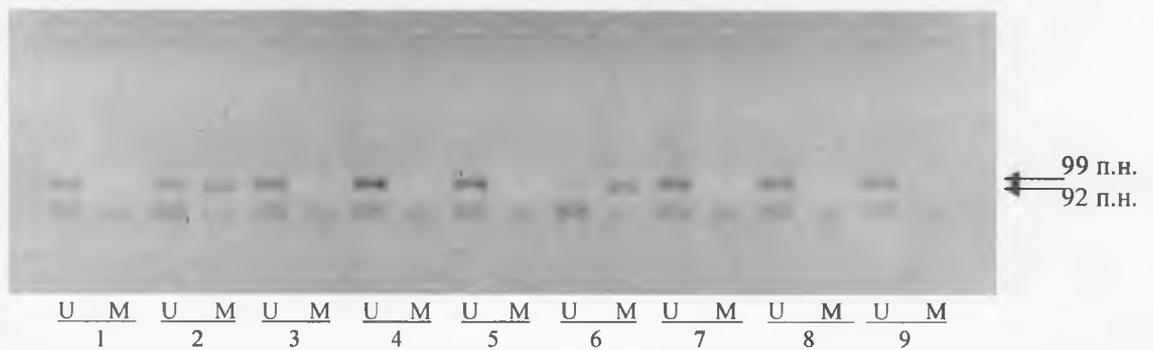


Рисунок 4 - Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену GSTP1. U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК

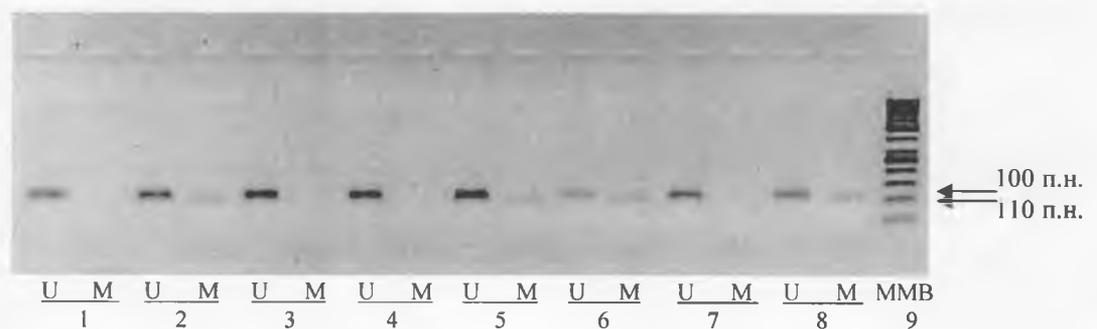


Рисунок 5 - Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену APC. U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК, MMB – маркер молекулярного веса

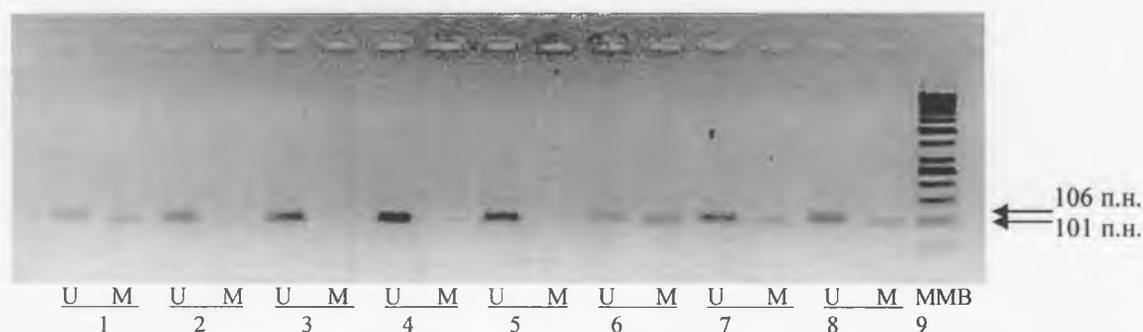


Рисунок 6 - Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену Cyclin D2. U – результат амплификации неметилированной ДНК, M – результат амплификации метилированной ДНК, ММВ – маркер молекулярного веса

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 $\beta$  – 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 $\beta$ , 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.