


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневиц
_____ 2011
Регистрационный № 164-1110



**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ
СОМАТИЧЕСКОЙ МУТАЦИИ T1799A ГЕНА BRAF В ТКАНИ
ЩИТОВИДНОЙ 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., к.м.н. Надыров Э.А.,
Мартыненко С.М., Тропашко И.Б., Силина А.А., Лазарева Н.Ф.,
Зекенова К.К., Камыш О.М., Евдочкова Т.И.

Гомель 2011

Целью данной инструкции является описание технологического процесса молекулярно-генетического типирования мутации T1799A гена BRAF, являющейся высокоспецифическим маркером злокачественного процесса щитовидной железы. Данная технология может быть использована для диагностики папиллярной формы рака щитовидной железы с использованием в качестве материала ткани щитовидной железы, взятой посредством тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ).

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

В таблице 1 приведен оптимальный вариант набора оборудования для организации работ по тестированию мутации T1799A гена BRAF.

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
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 ⁰ С	1
Холодильник от +2 до +8 ⁰ С с температурой в морозильной камере не менее минус 16 ⁰ 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-транслюминатор 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 ⁰ С с температурой в морозильной камере не менее минус 16 ⁰ 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 mM 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 mM смеси
Олигонуклеотидные праймеры 10 mM p-p	«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 узловых образованиях щитовидной железы сомнительных цитологических признаков папиллярного рака.

Противопоказания для применения

Отсутствуют.

Описание технологии используемого метода

1 Материал для исследования

Материалом для выделения ДНК с целью типирования мутации T1799A гена BRAF является ткань щитовидной железы, взятая посредством ТАБ. Процедура забора ткани осуществляется в процедурных кабинетах врачом-эндокринологом под контролем УЗИ 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.

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. При необходимости разбавление раствора ДНК осуществляется ТЕ буфером.

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 тестирования мутации Т1799А гена BRAF методом ПЦР

Тестирование осуществляется методом ПЦР, специфической к мутантному аллелю. Анализ проводится в один этап ПЦР с использованием трех различных олигонуклеотидных праймеров: 15-S 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3', MASA15Mut 5'-GGTGATTTTGGTCTAGCTACAAA-3', и MASA15R 5'-GCCAAAAATTТААТCAGTGGA-3'. Праймеры 15-S и MASA15R амплифицируют фрагмент 15 экзона гена BRAF размером 223 пары нуклеотидов (п.н.), в пределах которого происходит мутация Т1799А. Данный фрагмент продуцируется всегда и его выявление служит контролем качества выделенной ДНК и успешности проведения ПЦР. Праймеры MASA15Mut и MASA15R осуществляют амплификацию

только в том случае, если в образце ДНК присутствует мутация T1799A. При этом продуцируется фрагмент размером в 125 п.н.

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 (NH₄)₂SO₄), 1 мкл 10мМ смеси dNTP, 0,25 мкл 15-S 100 мкМ праймера и по 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера MASA15Mut и MASA15R, 3,5 мкл 25мМ MgCl₂, 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5ед./мкл), 1 мкл образца ДНК (20-50 нг/мкл), 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.

Амплификация проводится по следующей программе: 4 мин. при 95°С, затем 37 циклов 30-секундной денатурации при 94°С, отжиг праймеров - 30 сек. при температуре 55°С и элонгация 30 сек. при 72°С. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72°С и охлаждение до 4°С.

3 Электрофоретическая детекция мутации T1799A гена BRAF

3.1 Подготовка геля и буферных растворов

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

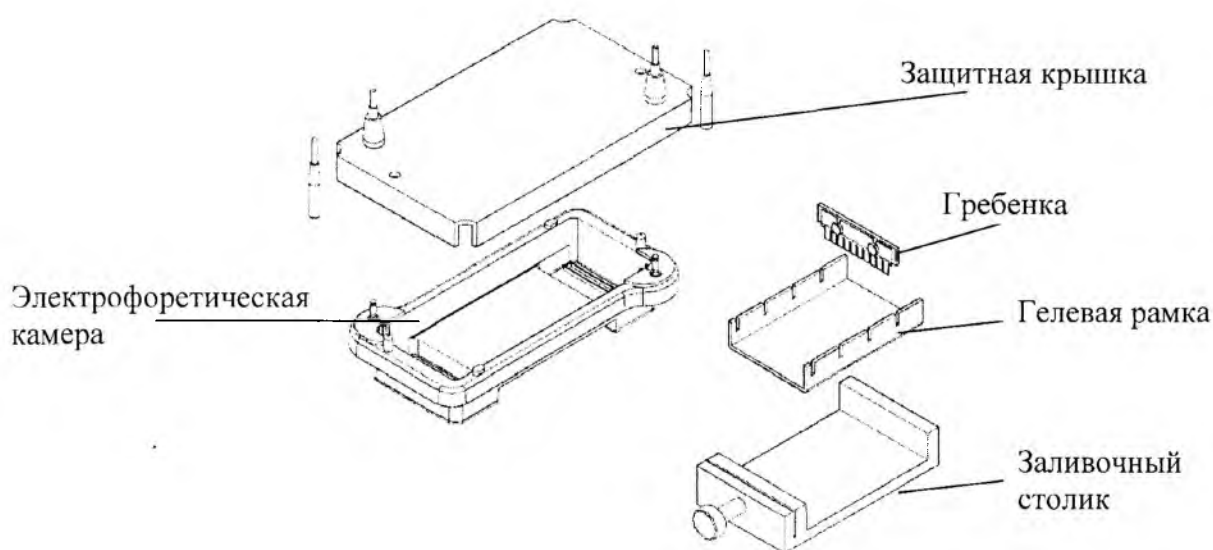


Рисунок 1 – Схематическое изображение электрофоретической камеры для агарозного гель-электрофореза

Для проведения электрофоретического анализа необходимо приготовление четырех основных растворов 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 0,5М 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 0,5М, 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 (катоде). 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 слу-

чае отсутствия видеосистемы результаты оцениваются визуально при обязательном покрытии геля защитным экраном, предотвращающим УФ-излучение.

Мутация T1799A выявляется на геле в виде дополнительной фракции размером в 125 п.н. Наглядно результат электрофоретической детекции мутации T1799A представлен на рисунке 2.

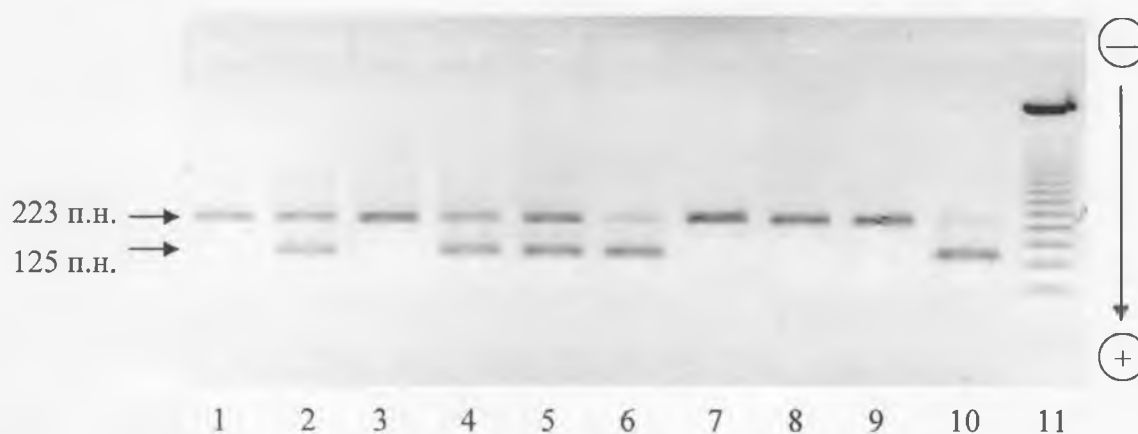


Рисунок 2 – Агарозный гель с результатами электрофоретического анализа образцов после амплификации (инвертированное изображение). Дорожки 1, 3, 7-9 – образцы без мутации, дорожки 2, 4-6 – образцы с мутацией T1799A, дорожка 10 – положительный контроль, дорожка 11 – маркер молекулярного веса 50-800 п.н. с шагом в 50 п.н.

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.