

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

Д.Л. Пиневич

30.09.2011 г.

Регистрационный № 064-0611

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МУТАЦИЙ
В ОНКОГЕНЕ BRCA1 (300T>G, 5382INSC) У ПАЦИЕНТОВ
С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКОМ ЯИЧНИКА МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

**УЗ «Гродненская областная клиническая больница»,
УО «Гродненский государственный медицинский университет»**

АВТОРЫ:

**Курстак И.А., канд. биол. наук Кузнецов О.Е.,
д-р мед. наук, проф. Ляликов С.А.,
канд. мед. наук, доц. Савицкий С.Э., канд. биол. наук, доц. Воробьев В.В.**

Гродно 2011

Инструкция разработана с целью определения мутаций 300T>G и 5382insC (5 и 20 экзон) гена BRCA1 у пациентов с раком молочной железы, раком яичника, а также у лиц, с наследственной предрасположенностью к опухолям данной локализации.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Стандартное оборудование лаборатории полимеразой цепной реакции (амплификатор-термоциклер, камера для электрофореза, трансиллюминатор, бокс 2-го класса защиты (ламинарный шкаф), облучатели бактерицидные, холодильник, термостат, ультрацентрифуга, вортекс, комплект автоматических дозаторов, наконечники 50-1000 мкл РНК/ДНК освобожденные с бактериальным фильтром, пробирки 0,5-1,5 мл типа «Эппendorф», халаты лабораторные, перчатки одноразовые, реагенты для выделения ДНК и постановки полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) (смесь dNTP, Таq – полимераза, Ferments Eco47I (Avall), Agaroze, ПЦР - буфер, маркер DNA Ladder, праймеры, дезинфектант, дистиллированная вода).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак молочной железы, рак яичников, наследственная предрасположенность к раку молочной железы, наследственная предрасположенность к раку яичников.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Не выявлены.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ BRCA1 У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Геномную ДНК из образцов крови выделяют с использованием наборов реагентов в асептических условиях по общепринятой методике.

Перечень необходимых реагентов:

1. Смесь dNTP, Fermentas.
2. Таq – полимераза, Fermentas.
3. Ferments Eco47I (Avall).
4. Agaroze, Fermentas.
5. ПЦР – буфер, Bio-Rad.
6. Маркер DNA Ladder, Fermentas.
7. Праймеры.
8. Дезинфектант.
9. Дистиллированная вода.

Перечень необходимых праймеров для определения мутаций:

	Праймер	Мутация	Определяемый экзон
1.	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	5382insC	Exon 20 – f

2.	CCTTTCTGTCCTGGGGATT	5382insC	Exon 20 – r
3.	CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	300T>G	Exon 5 – f
4.	TTCCTACTGTGGTTGCTTCC	300T>G	Exon 5 – r

Технология постановки реакции ПЦР с целью обнаружения мутаций гена BRCA:

- тестируемое ДНК – 2 мкл (100-200 нг)
- ПЦР смесь (для 10 реакций):

10x Таq полимераза буфер	25,0 мкл
25 mM MgCl ₂	15,0 мкл
10 mM dNTP	2,5 мкл
праймер 1	10,0 мкл
праймер 2	10,0 мкл
праймер 3	10,0 мкл
праймер 4	10,0 мкл
Тaq-полимераза	0,6 мкл
дистиллированная вода	146,9 мкл

Приготовление рабочего реагента: к 2 мкл тестируемого ДНК добавляют 23 мкл ПЦР смеси.

Программирование термоциклира и проведение амплификации:

94°C	10 мин	
94°C	25 с	
67°C	25 с	{ 10 циклов
72°C	35 с	
94°C	25 с	
55°C	40 с	{ 35 циклов
72°C	40 с	
72°C	7 мин	
4°C		

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации производят на агарозном геле – 12,5 мкл продукта, 120 В - 40 мин.

Продукты амплификации на агарозном геле детектируют при помощи трансиллюминатора (рис. 1).

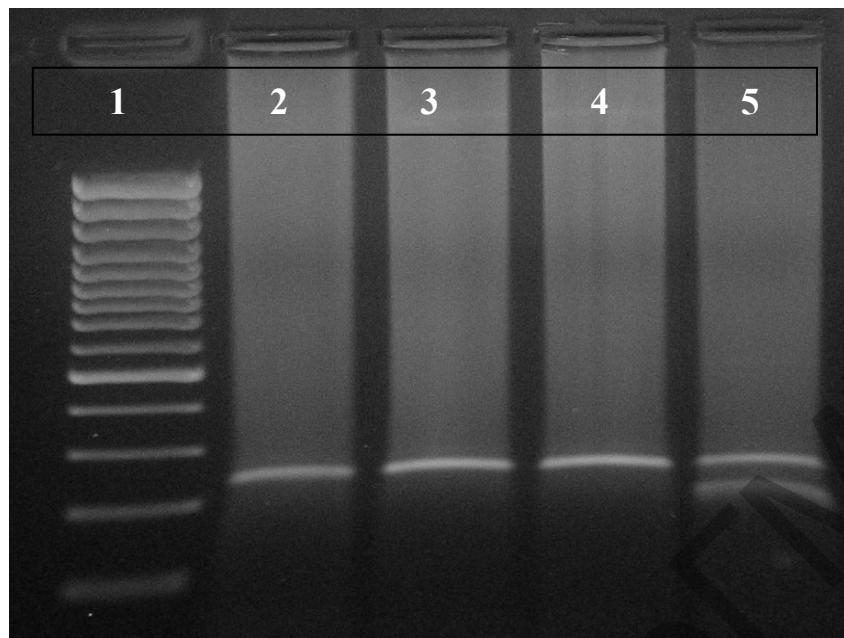


Рис. 1. Амплификация продуктов на агарозном геле:
1 – маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder;
2 – 4 исследуемое ДНК без мутации;
5 – обнаружена мутация 5382insC.

Рестрикция мутаций: 8 мкл продукта амплификации мутации 300T>G:
Рестрикционная смесь (на 10 исследований):

- буфер 20 мкл
- Ferments *Eco*47I (*Ava*II) 5 мкл
- дистиллированная вода 55 мкл

8 мкл продукта амплификации и рестрикционную смесь инкубируют при 37°C 12 – 20 часов, затем проводят электрофоретическое разделение продуктов амплификации на агарозном геле по общепринятой методике – 12,5 мкл продукта, 120V 40 мин.

Продукты амплификации на агарозном геле детектируют при помощи трансиллюминатора (рис. 2).

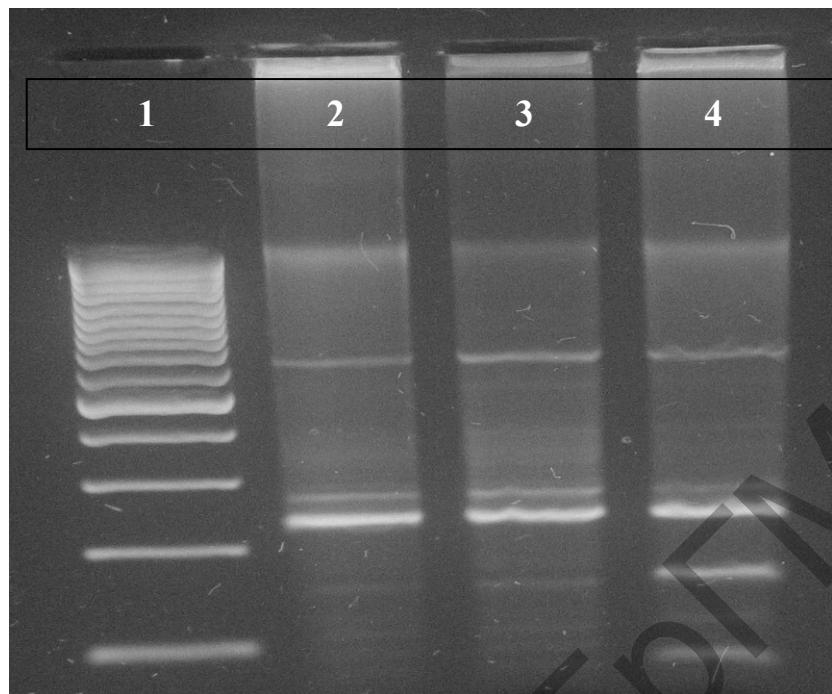


Рис. 2. Амплификация/рестрикция и анализ мутации 300T>G:
1 – маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder;
2 и 3 – исследуемое ДНК без мутации;
4 – обнаружена мутация 300T>G.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Ошибочные результаты при определении мутаций в гене BRCA1 могут быть получены при:

- использовании реагентов с истекшим сроком годности;
- неточном дозировании реагентов;
- неправильных условиях хранения биологического материала;
- несоблюдении времени и температуры амплификации.