

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель министра

Д.Л. Пиневич

« 20 » ноября 2013 г.

Регистрационный № 126-1013

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
АДЕНОКИСТОЗНОГО РАКА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

Инструкция по применению

**Учреждение-разработчик:** Государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр онкологии и медицин-  
ской радиологии им. Н.Н. Александрова»

**Авторы:**

д.б.н., доцент Р.М. Смолякова, к.м.н. М.А. Возмитель, Ю.В. Гуляева,  
к.м.н. А.Г. Жуковец, к.м.н. И.В. Белоцерковский

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
20.11.2013  
Регистрационный № 126-1013

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
АДЕНОКИСТОЗНОГО РАКА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ: д-р биол. наук, доц. Р.М. Смолякова, канд. мед. наук М.А. Возмитель, Ю.В. Гуляева, канд. мед. наук А.Г. Жуковец, канд. мед. наук И.В. Белоцерковский

Минск 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод молекулярно-генетической диагностики аденокистозного рака слюнных желез с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), заключающийся в определении химерного MYB-NFIB гена, выявление которого позволяет судить о гистогенезе опухолей слюнных желез базалоидного строения, точно диагностировать аденокистозный рак для выбора патогенетически обоснованного лечения. Метод, изложенный в инструкции, дополняет и уточняет клинические и морфологические (светооптические) методы диагностики.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-патологоанатомов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим раком слюнных желез базалоидного строения, в специализированных онкологических центрах, диспансерах.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **Оборудование**

Низкотемпературный морозильник (-70°C).

Термостат.

Вортекс.

Автоматические пипетки переменного объема.

Амплификатор.

УФ-трансиллюминатор.

УФ-бокс.

Камера электрофоретическая.

Холодильник бытовой.

### **Реактивы и расходные материалы**

Набор для выделения РНК.

Протеаза.

Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции.

Нуклеотидные праймеры: праймеры контроля ПЦР, диагностические праймеры.

Рекомбинантная Taq-полимераза.

ПЦР-буфер.

Смесь дНТР.

Деоиницированная вода.

2% агарозный гель.

Минеральное масло.

Микропробирки типа «эппендорф» разного объема.

Автоматические дозаторы.

Одноразовые наконечники для автоматических дозаторов.

Этанол (96%).

Ксилол.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Рак слюнных желез.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ЭТАПОВ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХИМЕРНОГО ГЕНА MYB-NF1B У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ ПОРАЖЕНИЕМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ**

### **Взятие материала**

Опухолевую ткань получают во время хирургического вмешательства либо в ходе диагностической пункционной биопсии, которые производятся стандартными методами.

Биологический материал доставляют в лабораторию, где допускается при необходимости его хранение при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Многократное размораживание биологического материала категорически запрещается!**

Для исследования используется ткань опухолей слюнных желез, фиксированная 10%-м раствором нейтрального формалина и заключенная в парафин.

Для последующего молекулярно-генетического анализа выбирают блок с сохраненной структурой ткани опухоли, без некроза и геморрагий при условии наличия опухоли не менее 75% объема тканевого материала.

### **I этап**

#### *Депарафинизация*

Выполняется в случае определения химерного гена MYB-NF1B в опухолевой ткани, заключенной в парафин.

1. В пробирку 1,5 мл помещается 2–3 среза опухолевой ткани, заключенной в парафин, толщиной 10 мк и более. Пробирки нумеруются.

2. В пробирки вносят по 1 мл ксилола, тщательно перемешивают на вортексе.

3. Инкубируют образцы 3 мин при  $50^{\circ}\text{C}$ , затем центрифугируют 2 мин на максимальных оборотах.

4. В пробирки вносят по 1 мл 96% этанола, вортексируют в течение 15 с и центрифугируют 2 мин при 10000 об./мин.

5. Удаляют полностью 96% этанол, оставляя образовавшийся осадок.

#### *Гомогенизация*

1. Опухолевую ткань тщательно гомогенизируют.

2. В пробирку 1,5 мл помещают гомогенизированную опухолевую ткань. Пробирки нумеруются.

#### *Выделение РНК из клеток опухоли слюнных желез*

Для определения химерного гена MYB-NF1B в опухолевой ткани слюнных желез выделение РНК проводят набором реагентов.

1. Вносят в каждую пробирку по 200 мкл лизирующего буфера.

2. Пробы тщательно перемешивают на вортексе.

3. Добавляют 4 мкл протеазы в каждую пробирку. Тщательно перемешивают на вортексе.

4. Образцы инкубируют 15 мин при температуре 50°C, затем 15 мин при температуре 80°C (Важно! Увеличение времени инкубации при температуре 80°C может быть причиной разрушения РНК).

5. Во время инкубации изготавливают смесь для активного выделения и 96% этанол: 240 мкл смеси для активного выделения смешать с 550 мкл этанола.

6. По истечении времени инкубации добавляют к образцам 790 мкл приготовленной смеси.

7. Аккуратно перемешивают пипетированием.

8. Аккуратно переносят полученную смесь, используя наконечники с аэрозольным барьером, в пробирку с фильтром. Пробы нумеруются. Центрифугируют в течение 30 с при 10000 об./мин.

9. Аккуратно извлекают фильтр и удаляют жидкость из пробирки, устанавливают фильтр на место. В пробы добавляют по 700 мкл отмывочного раствора № 1 (промывочный буфер № 1) и центрифугируют в течение 30 с при 10000 об./мин.

10. Аккуратно извлекают фильтр и удаляют жидкость из пробирки, устанавливают фильтр на место. Добавляют 500 мкл отмывочного раствора № 2/3 (промывочный буфер № 2/3) и центрифугируют в течение 30 с при 10000 об./мин.

11. Помещают фильтр в чистую пробирку объемом 1,5 мл.

12. Добавляют 50 мкл раствора для элюции РНК, центрифугируют в течение 1 мин при 10000 об./мин.

13. Удаляют фильтр, отбирают раствор в чистую пробирку, используя наконечники с аэрозольным барьером. Пробирки нумеруют.

14. Концентрацию полученной РНК проверяют с помощью спектрофотометрии. Полученный раствор РНК подлежит использованию для постановки реакции обратной транскрипции.

## **II этап**

### *Постановка реакции обратной транскрипции*

Для получения кДНК 1 мкг общей РНК обратно транскрибируется с применением набора реагентов для обратной транскрипции в амплификаторе.

Общий объем смеси для обратной транскрипции 10 мкл состоит из:

- |                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| - 10' буфер для обратной транскрипции | 2 мкл;   |
| - 25' дНТР                            | 0,8 мкл; |
| - 10' случайный праймер               | 2 мкл;   |
| - обратная транскриптаза              | 1 мкл;   |
| - ингибитор РНКаз                     | 1 мкл;   |
| - деионизированная вода               | 3,2 мкл. |

Реакцию обратной транскрипции проводят в триплетах для получения необходимого количества кДНК.

Условия амплификации, последовательность:

- 1) 25°C — 10 мин;

- 2) 37°C — 120 мин;
- 3) 85°C — 5 с;
- 4) 4°C — ∞.

Полученную кДНК разводят в ПЦР-буфере или деионизированной воде в 5–7 раз, при необходимости кДНК подлежит хранению при температуре -70°C и однократному размораживанию.

### III этап

#### Постановка ПЦР

Используют олигонуклеотидные праймеры и внутренние пробы. Для подтверждения синтеза кДНК все образцы следует амплифицировать с набором праймеров контрольного гена GAPDH (гены домашнего контроля), состоящего из 290 п.н. (пар нуклеотидов).

Последовательности для каждого из указанных генов:

*Химерный ген:*

MYB-1693F 5'GCAGGATGTGATCAAACAGG3';

NFIB-2078R 5'СТАТТСССAGCGGACTTCA 3'.

*Контрольный ген GAPDH:*

GAPDH (F) 5'TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG3';

GAPDH (R) 5'TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT3'.

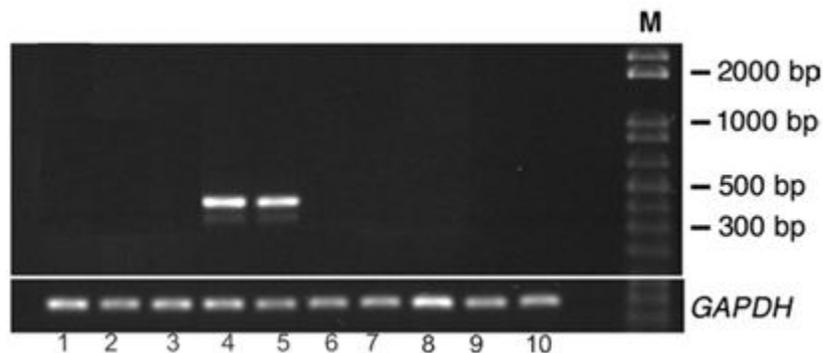
Реакционная смесь (общий объем 30 мкл) содержит 10 пмоль праймеров двух видов, 2 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 200 ммоль каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата и 2,5 ед. рекомбинантной Tag DNA полимеразы в ПЦР-буфере. Отрицательный и положительный контроли амплифицируют в каждом эксперименте. В качестве положительного контроля при ПЦР используют образцы опухолевой ткани, полученной от пациентов, страдающих аденокистозным раком. В качестве отрицательного контроля следует использовать ткань нормальной слюнной железы, полученную от пациентов, подвергшихся хирургическому лечению по поводу заболеваний, не связанных с новообразованиями слюнных желез (например, при шейной лимфодиссекции). ПЦР непосредственно проводят на амплификаторе.

Условия амплификации:

- 1) 95°C — 3 мин;
  - 2) 95°C — 30 с;
  - 3) 55°C — 30 с;
  - 4) 72°C — 30 с;
  - 5) 72°C — 10 мин;
  - 6) 4°C — ∞.
- } 35 циклов

Продукты ПЦР анализируют при помощи электрофореза в 2% агарозном геле на УФ-трансиллюминаторе с использованием маркера молекулярного веса.

На электрофореграмме представлен анализ результатов выявления химерного гена MYB-NFIB.



**Рис. — Гель-электрофорез химерного гена MYB-NFIB (в образцах 4 и 5 выявлено наличие химерного гена; М — маркер молекулярного веса, образец 1 — отрицательный контроль)**

Выявление на электрофореграмме специфического продукта ПЦР интерпретируется как наличие химерного гена MYB-NFIB в опухолевой ткани пациентов, страдающих раком слюнных желез, и позволяет диагностировать аденокистозный рак.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Ошибочные результаты при диагностике химерного гена MYB-NFIB в опухолевой ткани слюнных желез методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией могут быть получены при:

- неправильном заборе и транспортировке биологического материала;
- использовании реагентов с истекшим сроком годности;
- неточном дозировании реагентов;
- нарушениях в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

С целью повышения диагностической чувствительности и специфичности ПЦР-анализа необходимо включение в число тестируемых образцов при каждой процедуре анализа положительных и отрицательных контролей.