

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра

Ю.Л. Горбич

2025 г.

Регистрационный № 150-1224

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕРМИНАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ
В ГЕНАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ
РАКА ЯИЧНИКОВ, РАКА МАТОЧНОЙ ТРУБЫ,
ПЕРВИЧНОЙ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ**
(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ: Козубовская А.В., Скачкова В.О., Чеkun О.В., Луферова Ю.С.,
Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Василевская Ю.В., к.б.н. Пашкевич А.М.,
Хожовец М.В., к.б.н. Карпейчик Ю.В., к.м.н. Трухан А.В., к.м.н. Субоч Е.И.,
д.м.н. Мавричев С.А., д.м.н. Портянко А.С.

Минский р-н, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения герминальных мутаций в генах, ассоциированных с развитием рака яичников, рака маточной трубы, первичной перитонеальной карциномы, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику рака яичников, рака маточной трубы, первичной перитонеальной карциномы с наличием герминальных мутаций.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с раком яичников в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания.

1. Показания к применению: рак яичников (C56), рак маточной трубы (C57), первичная перитонеальная карцинома (C48).

2. Противопоказания к применению: соответствующие таковым к применению медицинских изделий, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

3. Перечень необходимых медицинских изделий, реагентов, расходных материалов и т.п.

1. Реагенты для выделения ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови и измерения концентрации двухцепочечной ДНК (согласно инструкции производителя).

2. Реагенты для постановки аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) (10× буфер для ПЦР, 50 мМ MgCl₂, 10 мМ смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ), Taq ДНК-полимераза, олигонуклеотиды синтетические (праймеры и зонды)).

3. Реагенты для секвенирования (10× буфер для ПЦР, 50 мМ MgCl₂, 10 мМ смесь дНТФ, ДНК-полимераза, олигонуклеотиды синтетические (праймеры), набор реагентов для секвенирования (версия 3.1), деионизированный формамид, TE-буфер для элюции ДНК, агароза,

деионизированная вода, спирт этиловый 96%, 0,125 М этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)).

4. Реагенты для высокопроизводительного секвенирования (согласно инструкции производителя).

5. Дозаторы автоматические переменного объема от 0,5 до 1000 мкл.

6. Одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов объемом от 0,5 до 1000 мкл.

7. Микропробирки для ПЦР объемом 0,2 и 1,5 мл.

8. 96-луночный планшет, септа для 96-луночного планшета.

9. Холодильник (2–8°C) с морозильной камерой (–20°C).

10. Низкотемпературный морозильник (от –70°C).

3. Технология использования предлагаемого метода

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется в несколько этапов.

1. Получение образца периферической венозной крови осуществляется общепринятыми методами. Кровь помещают в стерильную пробирку, содержащую этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (вакутейнер с сиреневой крышкой).

2. Выделение ДНК

2.1. использовать набор реагентов для выделения ДНК из крови согласно инструкции производителя;

2.2. чистоту и концентрацию выделенной ДНК в растворе оценить с помощью спектрофотометра, исходя из отношения поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (260 нм/280 нм).

3. Детекция патогенных вариантов с.5266dup, с.4035delA, с.181T>G в гене *BRCA1*, с.658_659del и с.5946delT в гене *BRCA2* с применением АС-ПЦР в режиме реального времени в формате TaqMan.

3.1. праймеры и зонды предварительно развести до концентрации 100 пмоль/мкл;

3.2. приготовить смесь праймеров отдельно для каждого патогенного варианта в соотношении 1F : 1R : 1Z mut : 1 Z wt : 6H₂O (где, F (forward) – прямой праймер, R (reverse) – обратный праймер, Z mut (mutant type) – зонд на мутантный тип, Z wt (wild type) – зонд на дикий тип); концентрация каждого праймера в итоговой смеси должна составлять 10 пмоль/мкл; хранить при температуре –20°C не более 6 месяцев;

3.3. разморозить и тщательно перемешать все компоненты ПЦР-смеси (кроме Таq ДНК-полимеразы чтобы избежать инактивации фермента), переворачиванием (10 раз), а затем осадить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием;

3.4. приготовить реакцию смесь отдельно для каждого патогенного варианта из расчета количества реакций n+3, где n – число образцов в постановке согласно таблице 1.

Таблица 1 – Компоненты реакционной смеси для проведения ПЦР

№ п-п	Реактив	Количество на 1 реакцию, мкл
1.	Буфер для ПЦР, 10×	2,5
2.	MgCl ₂ , 50 мМ	1,0
3.	дНТП, 10 мМ	0,5
4.	Таq ДНК-полимеразы, 5 ед/мкл	0,2
5.	Смесь праймеров	0,8
6.	Деионизированная вода (H ₂ O)	18,0
7.	ДНК-матрица	2
8.	Общий объем	25

3.5. включить в каждую постановку ПЦР отрицательные и положительные контроли (в качестве отрицательного контроля использовать дистиллированную воду, в качестве положительного контроля – образец ДНК с исследуемым патогенным вариантом в генах *BRCA1* и *BRCA2*, подтвержденным методом секвенирования по Сэнгеру); при раскапывании реакционной смеси в первую очередь внести отрицательный контроль, далее образцы и, в последнюю очередь, положительный контроль.

Последовательности олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры и зонды для ПЦР

№ п-п	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5'-3'	Метка, 5'	Метка, 3'
Праймеры				
1	BRCA1_181T>G_F	GCATGCTGAAACTTCTCAACC	-	-
2	BRCA1_181T>G_R	GGTTGCTTCCAACCTAGCA	-	-
3	BRCA1_4035delA_F	GAAAGCCAGGGAGTTGGTCT	-	-
4	BRCA1_4035delA_R	CCATGCTTTGCTCTTCTTGA	-	-
5	BRCA1_5266dup_F	GAAGAAACCACCAAGGTCCA	-	-
6	BRCA1_5266dup_R	CAGAGTGGTGGGGTGAGATT	-	-
7	BRCA2_658_659del_F	TCATTTTGTTCAAATGTGTCATG	-	-
8	BRCA2_658_659del_R	AATCAATGTCATATTTACTTACAGCAG	-	-
9	BRCA_5946del_F	TCTGCAAATACTTGTGGGATTTT	-	-
10	BRCA_5946del_R	CTTGCGTTTTGTAATGAAGCA	-	-
Зонды				
11	BRCA1_181T>G_Z mut	GCCTTCACAGGTCCTTTATTT	ROX	BHQ2
12	BRCA1_181T>G_Z wt	GCCTTCACAGTGTCTTTATGT	FAM	BHQ1
13	BRCA1_4035delA_Z mut	GATGATGAGAAAGAGGAACGG	ROX	BHQ2
14	BRCA1_4035delA_Z wt	GATGATGAAGAAAGAGGAACGG	FAM	BHQ1
15	BRCA1_5266dup_Z mut	GCAAGAGAATCCCCAGGAC	ROX	BHQ2
16	BRCA1_5266dup_Z wt	GCAAGAGAATCCCAGGACAG	FAM	BHQ1
17	BRCA2_658_659del_Z mut	AGCATCTGAAACTATTTCTCATG	ROX	BHQ2
18	BRCA2_658_659del_Z wt	GCATCTGAAACTGTATTTCTCTCA	FAM	BHQ1
19	BRCA2_5946del_Z mut	AGCACAGCAAGGGAAAATCT	ROX	BHQ2
20	BRCA_5946del_Z wt	AGCACAGCAAGTGGAATAATCT	FAM	BHQ1

Примечание: F (forward) – прямой праймер, R (reverse) – обратный праймер, Z mut (mutant type) – зонд на мутантный тип, Z wt (wild type) – зонд на дикий тип

3.6. перемешать смесь пипетированием и поместить в амплификатор детектирующий для проведения ПЦР в режиме реального времени (адаптированный протокол амплификации представлен в таблице 4).

Таблица 4 – Программа амплификации

Этап	Характеристика		
	температура, °C	время, с	количество циклов, п
Предварительная денатурация	95	300	1
Денатурация	95	10	9
Отжиг (без детекции сигнала)	60	50	
Денатурация	95	15	30
Отжиг (детекция сигнала)	60	50	

3.7. провести анализ результатов по каналам FAM и ROX или аналогичным им по длинам волн во время этапа отжига:

1) отрицательный контроль – обязательным условием является отсутствие сигнала по каналам FAM и ROX;

2) положительный контроль – обязательным условием является наличие сигнала по каналам FAM и ROX;

3) исследуемые образцы:

– наличие сигнала только по каналу FAM – исследуемый образец характеризуется отсутствием исследуемой мутации;

– наличие сигнала только по каналу ROX – исследуемый образец характеризуется наличием мутации в гомозиготном состоянии;

– наличие сигналов по каналам FAM и ROX – исследуемый образец характеризуется наличием мутации в гетерозиготном состоянии.

4. Секвенирование 2 экзона, 1–80, 1835–2039 и 3564–3852 кодонов 10 экзона, 4485–4675 кодонов 14 экзона, 4676–4809 кодонов 15 экзона гена *BRCA1*

4.1. приготовить общую реакционную смесь для амплификации исследуемых участков ДНК исходя из количества тестируемых проб и расчета реагентов на одну реакцию согласно таблице 5.

Таблица 5 – Компоненты реакционной смеси для проведения ПЦР

Компоненты	Количество на 1 реакцию, мкл
10× реакционный буфер	2,5
MgCl ₂ , 50 mM	1
dNTP, 10 mM	0,5
ДНК-полимераза, 5 ед/мкл	0,2
F (forward) – прямой праймер, 10 пМ/мкл	0,3
R (reverse) – обратный праймер, 10 пМ/мкл	0,3
ДНК-матрица	1-2
Деионизированная вода	до объема 25
Общий объем	25

Последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров

Ген	Экзон	Патогенный вариант	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
<i>BRCA1</i>	2	c.53T>C c.68_69del	F – GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT R – TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT
<i>BRCA1</i>	10	c.1961delA	F – GGAGGAAGTCTTCTACCAGGC R – TTCTTGGCTCCAGTTGCAGG
<i>BRCA1</i>	10	c.3700_3704del c.3756_3759del	F – GAGTCCTAGCCCTTTCACCCATACAC R – GTGATGTTCTGAGATGCCTTTG

Продолжение таблицы 6

<i>BRCA1</i>	14	c.4516delG c.4675G>A	F – GCCCAGCAAGTATGATTTGTC R – CAGAATATCTTTATGTAGGATTTCAGAG
<i>BRCA1</i>	15	c.4689C>G	F – TCCACCAACACTGTATTCATGT R – GGAACCTTTCAATGCAGAGGTTG

Примечание: F (forward) – прямой праймер, R (reverse) – обратный праймер

4.2. перемешать смесь пипетированием (10 раз) и поместить в амплификатор (протокол амплификации представлен в таблице 7).

Таблица 7 – Протокол амплификации

Этап	Характеристика программы		
	температура, °C	время, с	количество циклов, абс.
Начальная денагурация	95	900	1
Денагурация	95	15	35
Отжиг праймеров	56-62	10	
Элонгация	72	60	
Заключительная элонгация	72	300	1
Хранение	4	∞	1

4.3. провести качественную оценку ПЦР-продукта путем гель-электрофореза (1,5% агарозный гель, объем продукта 4 мкл, мощность 120 В, время 10 минут) с последующей детекцией результатов на трансиллюминаторе;

4.4. провести очистку продукта амплификации:

4.4.1. приготовить общую реакционную смесь для очистки продукта амплификации исходя из количества тестируемых проб и расчета реагентов на одну реакцию согласно таблице 8;

Таблица 8 – Компоненты реакционной смеси для очистки продуктов амплификации

Компоненты	Количество на 1 реакцию, мкл
0,125 М ЭДТА	1,5
96% этанол (C ₂ H ₅ OH)	45
Общий объем	46,5

4.4.2. внести 46,5 мкл общей реакционной смеси и 10 мкл ПЦР-продукта в каждую пробирку для очистки продукта амплификации;

4.4.3. перемешать смесь пипетированием (10 раз) и инкубировать при комнатной температуре (15–25°C) в течение 20 минут;

4.4.4. центрифугировать образцы при 14 000 об/мин. в течение 15–20 минут;

4.4.5. удалить супернатант и высушить в термостате при температуре до 56°C в течение 14 минут;

4.4.6. растворить осадок в дистиллированной воде или в ТЕ-буфере для элюции ДНК.

4.5. провести качественную оценку очищенного продукта путем геле-электрофореза (1,5% агарозный гель, объем продукта 4 мкл, мощность 120 В, время 10 минут).

4.6. приготовить общую реакционную смесь для постановки сиквенсовой реакции исходя из количества тестируемых проб и расчета реагентов на одну реакцию согласно таблице 9;

Таблица 9 – Компоненты реакционной смеси для сиквенсовой реакции

Компоненты	Количество на 1 реакцию, мкл
Набор для секвенирования, версия 1.1 / версия 3.1	2
F (forward) – прямой праймер, 10 пМ/мкл	0,3
R (reverse) – обратный праймер, 10 пМ/мкл	0,3
Очищенный ПЦР-продукт	1–3
Деионизированная вода	до объема 10
Общий объем	10

4.7. перемешать смесь пипетированием (10 раз) и поместить в амплификатор, протокол амплификации представлен в таблице 10;

Таблица 10 – Программа амплификации

Этап	Характеристика программы		
	температура, °C	время, с	количество циклов, абс.
Начальная денатурация	96	60	1
Денатурация	96	10	28
Отжиг	50	5	
Элонгация	60	240	

4.8. провести очистку продукта амплификации:

4.8.1. приготовить общую реакционную смесь для очистки продуктов сиквенсовой реакции согласно таблице 11;

Таблица 11 – Компоненты реакционной смеси для очистки продуктов сиквенсовой реакции

Компоненты	Количество на 1 реакцию, мкл
0,5 М ЭДТА	2,5
96% этанол (C ₂ H ₅ OH)	36
Общий объем	38,5

4.8.2. внести 38,5 мкл общей реакционной смеси и 10 мкл ПЦР-продукта в каждую пробирку для очистки продукта амплификации;

4.8.3. перемешать смесь пипетированием (10 раз) и инкубировать при комнатной температуре (15–25°C) в течение 20 минут;

4.8.4. центрифугировать образцы при 14 000 об/мин. в течение 15–20 минут;

4.8.5. удалить супернатант и высушить в термостате при температуре до 56°C в течение 14 минут;

4.8.6. растворить осадок в 15 мкл деионизированного формамида;

4.8.7. провести денатурацию образцов при температуре 95°C в течение 3 минут, затем резко охладить пробирки, поместив их на 3–4 минуты в морозильник (–20°C);

4.9. внести 15 мкл очищенного продукта сиквенсовой реакции в лунки 96-луночного планшета, закрыть септой для 96-луночного планшета;

4.10. поместить планшет в генетический анализатор, запустить прибор;

4.11. выполнить анализ данных с использованием программного обеспечения генетического анализатора, полученные последовательности ДНК сравнить с референсной последовательностью гена *BRCA1* (NM_007294.4), размещенной в электронной базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

5. Высокопроизводительное таргетное секвенирование

Использовать коммерческие наборы реагентов для проведения высокопроизводительного таргетного секвенирования согласно инструкции производителя. Минимальная панель генов должна включать: *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIPI*, *ATM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *FANCC*, *FANCF*, *FANCM*.

6. Интерпретация результата

Обнаружение герминальных патогенных либо вероятно-патогенных мутаций (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) в исследованной панели генов

свидетельствует о наличии рака яичников, рака маточной трубы, первичной перитонеальной карциномы с герминальными патогенными либо вероятно-патогенными мутациями в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIPI*, *ATM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *FANCC*, *FANCF*, *FANCM*.

5. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении метода и пути их устранения

Использование реагентов с истекшим сроком годности, несоблюдение времени инкубации, температурного режима и т.д.

Устранение: не использовать реагенты с истекшим сроком годности, точно следовать инструкции к используемому набору реагентов, соблюдать температурный режим при проведении исследования.