

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л. Горбич

«31» 2024 г.

Регистрационный №152-1224

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ**
(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Субоч Е.И., Чехович Т.А., Чекун О.В.,
Луферова Ю.С., Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Василевская Ю.С.,
Хожовец М.В., к.б.н. Пашкевич А.М., к.б.н. Карпейчик Ю.В.,
д.м.н., профессор Портянко А.С.

Минский р-н, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения мутаций в генах, ассоциированных с развитием доброкачественных новообразований органов пищеварения, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику доброкачественных новообразований органов пищеварения.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, врачей-хирургов, врачей-эндоскопистов, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с доброкачественными новообразованиями тонкой и толстой кишки в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания.

1. Показания к применению: доброкачественные новообразования ободочной кишки, прямой кишки, заднего прохода (ануса) и анального канала (D12), доброкачественные новообразования других и неточно обозначенных органов пищеварения: двенадцатиперстной кишки (D13.2); других и неуточнённых отделов тонкого кишечника (D13.3).

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 периферической венозной крови и измерения концентрации двухцепочечной ДНК (согласно инструкции производителя).

2. Реагенты для секвенирования по Сэнгеру (реакционный буфер, ДНК-полимераза, олигонуклеотиды синтетические (праймеры), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ), набор реагентов для секвенирования (версия 3.1), деионизированный формамид, буфер для элюции ДНК, агароза, деионизированная вода, спирт этиловый 96%, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) 0,125 М).

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

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

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

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

7. 96-луночный планшет, септа для 96-луночного планшета.

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

9. 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. используют набор реагентов для выделения ДНК из крови, согласно инструкции производителя;

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

Хранить раствор с выделенной ДНК при температуре –20°C в течение 1 месяца, при температуре –70°C – более 1 месяца.

3. Секвенирование 4 экзонной и интронной областей, 6 экзона, 2995–3420, 3780–4228 и 4549–5019 кодонов 16 экзона гена *APC*, секвенирование 1–9 экзонов гена *STK11*

3.1. приготовить общую реакционную смесь для амплификации исследуемых участков ДНК генов *APC* и *STK11* исходя из количества

тестируемых проб и расчета реагентов на одну реакцию согласно таблицам 1 и 2;

Таблица 1 – Компоненты реакционной смеси для проведения ПЦР (*APC*)

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

Таблица 2 – Компоненты реакционной смеси для проведения ПЦР (*STK11*)

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

Последовательности праймеров представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Последовательности праймеров

Ген	Экзон (кодоны)	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
<i>APC</i>	4	F – TTACCCTGACCCAAGTGG R – CCAGTACTTTCTCTGCTTCCATTT
<i>APC</i>	6	F – CATGCACCATGACTGACGTA R – AGCTCTTCCCTGTTTTATCACTT
<i>APC</i>	16.1 (2995–3420)	F- TCAATACCCAGCCGACCT R - GGCTTATCATCTTCATAGTCA
<i>APC</i>	16.2 (3780–4228)	F- AGACTTATTGTGTAGAAGATAC R - ATGGTTCACCTCTGAACGGA
<i>APC</i>	16.3 (4549–5019)	F- ACAGAAAGATGTGGAATTAAG R - TTCTCCAGCAGCTAACTCAT
<i>STK11</i>	1	F – GTCGGAACACAAGGAAGGAC R – GACCCCAGCAAGCCATACT
<i>STK11</i>	2	F – TCCCACAGCACTGTGAACTC R – ATTGCCACAATGGCTGACTT
<i>STK11</i>	3	F – TTTCAGAGGGGTGGCTGAG R – CTGGGCGACAGAGTGAGACT
<i>STK11</i>	4-5	F – GTGTGCCTGGACTTCTGTGA R – CCACCATCTGCCGTATGAG

Продолжение таблицы 3

<i>STK11</i>	6	F – GGTGTCCTTGAGTCCACAGG R – CAGTCCTCTCAATGCCTGCT
<i>STK11</i>	7	F – GGAGTGGAGTGGCCTCTGT R – ACAGGACACTGCCCAGAGA
<i>STK11</i>	8	F – ATGGCTGAGCTTCTGTGGTC R – CTTTGGGGACGTGGGATT
<i>STK11</i>	9	F – GGATACACCTGGGCCTGAC R – CAAAGGCCACATGGCAAC

F – прямой праймер, *R* – обратный праймер

3.2. перемешать смесь пипетированием (10 раз) и поместить в амплификатор (протоколы амплификации для исследования участков ДНК генов *APC* и *STK11* представлены в таблицах 4 и 5);

Таблица 4 – Протокол амплификации (*APC*)

Этап	Характеристика программы		
	температура, °C	время, с	количество циклов, абс.
Начальная денатурация	98	30	1
Денатурация	98	5	35
Отжиг праймеров	60	10	
Элонгация	72	30	
Финальная элонгация	72	300	1
Хранение	4	∞	1

Таблица 5 – Протокол амплификации (*STK11*)

Этап	Характеристика программы		
	температура, °C	время, с	количество циклов, абс.
Начальная денатурация	95	120	1
Денатурация	95	10	35
Отжиг праймеров	58-60	10	
Элонгация	72	60	
Финальная элонгация	72	300	1
Хранение	4	∞	1

3.3. провести качественную оценку ПЦР-продукта путем гель-электрофореза (1,5% агарозный гель, объем продукта 4 мкл, мощность 200 В, время 10 минут) с последующей детекцией результатов на трансиллюминаторе;

3.4. провести очистку продукта амплификации:

3.4.1. приготовить общую реакционную смесь для очистки продукта амплификации исходя из количества тестируемых проб и расчета реагентов на одну реакцию согласно таблице 6;

Таблица 6 – Компоненты реакционной смеси для очистки продуктов амплификации

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

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

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

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

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

3.4.6. растворить осадок в дистиллированной воде или в буфере для элюции ДНК.

3.5. провести качественную оценку очищенного продукта путем гелелектрофореза (1,5% агарозный гель, объем продукта 4 мкл, мощность 200 В, время 10 минут).

3.6. приготовить общую реакционную смесь для постановки сиквенсовой реакции исходя из количества тестируемых проб и расчета реагентов на одну реакцию согласно таблице 7;

Таблица 7 – Компоненты реакционной смеси для постановки сиквенсовой реакции

Компоненты	Объем на 1 реакцию, мкл
Набор для секвенирования, версия 1.1	2
Прямой праймер	0,3
Обратный праймер	0,3
Очищенный ПЦР-продукт	1–3
Деионизированная вода	до объема 10
Общий объем	10

3.7. перемешать смесь пипетированием (10 раз) и поместить в амплификатор, протокол амплификации представлен в таблице 8;

Таблица 8 – 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	

3.8. провести очистку продукта амплификации:

3.8.1. приготовить общую реакционную смесь для очистки продуктов сиквенсовой реакции согласно таблице 9;

Таблица 9 – Компоненты реакционной смеси для очистки продуктов сиквенсовой реакции

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

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

3.8.3. перемещать смесь пипетированием (10 раз) и инкубировать при температуре –20°C в течение 1 часа;

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

3.8.5. удалить супернатант и высушить в термостате при температуре до 56°C в течение 15 минут;

3.8.6. растворить осадок в 15 мкл деионизированного формамида;

3.8.7. 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);

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

3.10. поместить планшет в генетический анализатор, запустить прибор;

3.11. выполнить анализ данных с использованием программного обеспечения генетического анализатора, полученные последовательности ДНК сравнить с референсными последовательностями участков генов *APC*

(NM_000038.6) и *STK11* (NM_000455.5), размещенными в электронной базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

4. Высокопроизводительное таргетное секвенирование

Использовать коммерческие наборы реагентов для проведения высокопроизводительного таргетного секвенирования, согласно инструкции производителя. Минимальная панель генов должна включать: *APC*, *MUTYH*, *STK11*, *SMAD4*, *BMPR1A*, *PTEN*, *SDHD*, *POLE*, *POLD1*, *GREM1*, *NTHL1*, *AXIN2*, *RNF43*, *MBD4*.

5. Интерпретация результата

Обнаружение герминальных патогенных либо вероятно-патогенных вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) в генах *APC*, *MUTYH*, *STK11*, *SMAD4*, *BMPR1A*, *PTEN*, *SDHD*, *POLE*, *POLD1*, *GREM1*, *NTHL1*, *AXIN2*, *RNF43*, *MBD4* свидетельствует о наличии доброкачественных новообразований органов пищеварения с герминальными патогенными либо вероятно-патогенными вариантами в генах *APC*, *MUTYH*, *STK11*, *SMAD4*, *BMPR1A*, *PTEN*, *SDHD*, *POLE*, *POLD1*, *GREM1*, *NTHL1*, *AXIN2*, *RNF43*, *MBD4*.

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.