

Министерство здравоохранения Республики Беларусь



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 155-999

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА РСА3 И
АМПЛИФИКАЦИИ ХИМЕРНОГО ОНКОГЕНА TMPRSS2-ERG**

Инструкция по применению

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

Авторы: Т.А. Чехович, С.Ю. Смирнов, С.В. Шиманец, К.Г. Рукша, к.м.н. А.В. Карман, к.м.н. Е.И. Субоч, д.м.н. А.С. Портянко, д.м.н., проф., член-корр. НАН Беларуси С.А. Красный

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен метод определения уровня экспрессии гена PCA3 и амплификации химерного онкогена TMPRSS2-ERG с использованием технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР), который может быть использован в комплексе медицинских услуг по диагностике рака предстательной железы (РПЖ).

Метод предназначен для врачей-онкологов, врачей-урологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим РПЖ.

1. Показания к применению: принятие решения о выполнении повторной биопсии у пациентов с подозрением на РПЖ.

2. Противопоказания к применению: отсутствуют.

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

Перечень необходимых медицинских изделий:

3.1. Бокс биологической безопасности 2 класса (тип В2 (без рециркуляции)).

3.2. Центрифуга медицинская лабораторная, обеспечивающая скорость вращения ротора до 2500 об/мин.

3.3. Термостат твердотельный с функцией охлаждения (4-100°C).

3.4. Вортекс.

3.5. Микроцентрифуга, обеспечивающая скорость вращения ротора до 14000 об/мин.

3.6. Амплификатор (термоциклер) для проведения ПЦР в режиме реального времени.

3.7. Автоматические дозаторы переменного объема.

- 3.8. Холодильник (2-8°C).
- 3.9. Низкотемпературный морозильник (-70°C).
- 3.10. Прибор для горизонтального электрофореза.
- 3.11. Система гель-документации.
- 3.12. Магнитная мешалка с подогревом.
- 3.13. Весы лабораторные.

Перечень необходимых реактивов и расходных материалов:

- 3.14. Набор реагентов для стабилизации и очистки РНК (RNeasy Protect Cell Mini Kit, Qiagen или аналог).
- 3.15. Набор реагентов для выделения общей фракции РНК (сорбционный принцип).
- 3.16. Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции.
- 3.17. Набор реагентов для ПЦР в режиме реального времени.
- 3.18. Набор реагентов для ПЦР (AmpliTaq Gold® 360 Master Mix, Life Technologies или аналог).
- 3.19. Олигонуклеотиды синтетические (праймеры и зонды).
- 3.20. Олигонуклеотид синтетический к гену В-актина.
- 3.21. Буфер натрий-фосфатный (1×).
- 3.22. Спирт этиловый 70%.
- 3.23. ДНК-маркер молекулярного веса 100bp (100 до 1000 н.п.).
- 3.24. Агароза.
- 3.25. Трис-боратный электродный (ТВЕ) буфер (10×).
- 3.26. Раствор бромистого этидия 1%.
- 3.27. Буфер для загрузки образцов в гели (6×).
- 3.28. Стерильные пластиковые контейнеры в закручивающейся крышечкой объемом 30 мл.
- 3.29. Пробирки центрифужные объемом 15 мл.
- 3.30. Микропробирки объемом 1,5 мл.

3.31. Микропробирки объемом 0,2 мл или микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, имеющие маркировку для ПЦР и оптические крышки к ним.

3.32. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.

3.33. Хладоэлемент.

4. Технология использования предлагаемого метода

4.1. Требования, предъявляемые к забору, транспортировке и хранению материала для исследования.

Для проведения исследования используется первая порция мочи в объеме не менее 30 мл. Забранный в стерильные пластиковые контейнеры биологический материал помещается на хладоэлемент и доставляется в лабораторию.

При необходимости допускается хранение мочи при температуре 4–8°C в течение 1 часа.

4.2. Получение клеточного осадка мочи.

Клеточный осадок получают непосредственно после забора биологического материала путем центрифугирования 2 пробирок по 15 мл мочи в течение 10 мин при 2300-2500 об/мин. При необходимости (визуальное наличие примесей солей в моче), осадок ресуспензируют в натрий-фосфатном буфере и повторно центрифугируют в течение 10 мин при 2300-2500 об/мин. Для хранения клеточного осадка мочи используется набор реагентов для стабилизации и очистки РНК (RNeasy Protect Cell Mini Kit, Qiagen или аналог), согласно инструкции производителя.

При необходимости допускается хранение биологического материала при температуре –20°C в течение 2 месяцев.

4.3. Выделение общей фракции РНК из клеточного осадка мочи.

Для проведения процедуры исследования используются набор реагентов для выделения общей фракции РНК, основанный на сорбционном принципе, согласно инструкции производителя, спирт этиловый 70%. Чистота препарата и концентрация полученной РНК оцениваются

спектрофотометрически, исходя из соотношения поглощения при длинах волн 260/280 нм.

При необходимости допускается хранение РНК при температуре -20°C в течение 1 месяца и однократное размораживание.

4.4. Постановка реакции обратной транскрипции.

Для синтеза кДНК, который проводится непосредственно после получения общей фракции РНК, используется набор реагентов для постановки реакции обратной транскрипции, согласно инструкции производителя.

При необходимости допускается хранение кДНК при температуре -20°C в течение 1 месяца и однократное размораживание.

4.5. Постановка ПЦР в режиме реального времени.

Для амплификации фрагментов кДНК гена PCA3 применяется набор реагентов для проведения ПЦР в режиме реального времени, согласно инструкции производителя, и олигонуклеотиды синтетические (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры и зонды для амплификации

Ген	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
KLK3	F – GACCACCTGCTACGCCTCA R – GGAGGTCCACACACTGAAGTTTC P – FAM-CAGCATTTGAACCAGAGGAGTTCTTGACCC-BHQ1
PCA3	F – GGTGGGAAGGACCTGATGATAC R – GGGCGAGGCTCATCGAT P – FAM-AGAAATGCCCGGCCGCCATC-BHQ1

где, F– прямой праймер, R– обратный праймер, P – зонд.

В качестве эндогенного контроля используется ген В-актина. Присутствие в образце клеток предстательной железы определяется по наличию экспрессии простат-специфичного гена KLK3 (внутренний контроль).

Постановку для каждого биологического образца проводят в двух повторах согласно протоколу, представленному в таблице 2.

Таблица 2 – Протокол амплификации в режиме реального времени

Этап	Характеристика		
	температура, °С	время	количество циклов, n
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	15 с	45
Отжиг	60	1 мин	

4.6. Постановка ПЦР с детекцией результатов в гель-электрофорезе.

Для амплификации химерного онкогена TMPSSR2-ERG используется набор реагентов для ПЦР, согласно инструкции производителя, и синтетические олигонуклеотиды, представленные в таблице 3.

Таблица 3 – Праймеры и зонды для амплификации

Ген	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Размер продукта, п.о.
TMPRSS2-ERG	F – TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG R – GTAGGCACACTCAAACAACGACTGG	125
TMPRSS2-ERG	F – CGCGAGCTAAGCAGGAG R – GTCCATAGTCGCTGGAGGAG	180
TMPRSS2-ERG	F – CAGGAGGCGGAGGCGGA R – GGCGTTGTAGCTGGGGGTGAG	595

где, F– прямой праймер, R– обратный праймер.

Каждая постановка включает в себя отрицательный и положительный контроли. В качестве положительного контроля используется образец кДНК, полученный из опухоли предстательной железы с наличием транслокации TMPRSS2-ERG.

Условия амплификации представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Протокол амплификации

Этап	Характеристика		
	температура, °С	время	количество циклов, n
Предварительная денатурация	95	7 мин	1
Денатурация	95	25 с	45
Отжиг	64	45 с	

Элонгация	72	1 мин	
Заключительная элонгация	72	10 мин	

Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводится в 2% агарозном геле при напряженности электрического поля 10 В/см в течении 1 часа. Для определения относительной молекулярной массы фрагментов ДНК используется ДНК-маркер молекулярного веса 100bp, вносимый в отдельную лунку геля.

4.7. Анализ результатов.

4.7.1. Для оценки уровня экспрессии гена PCA3 используется метод dCt .

Для этого получают значения уровня флюоресценции генов PCA3 и KLK3 для каждого образца, обозначая их Ct . Вычисляют значения dCt согласно следующей формуле:

$$dCt = Ct (PCA3) - Ct (KLK3), \text{ где}$$

dCt – уровень экспрессии гена PCA3 в клеточном осадке мочи, нормализованный по референсному гену;

$Ct (PCA3)$ – значение уровня флюоресценции гена PCA3;

$Ct (KLK3)$ – значение уровня флюоресценции гена KLK3.

4.7.2. Для выявления амплификации химерного онкогена TMPSSR2-ERG полученный ампликон анализируется в агарозном геле по размеру продукта, соответствующего 125, 180 и 595 п.о.

4.7.3. Интерпретация результатов:

Высокая вероятность положительного результата биопсии ПЖ:

- $dCt \leq 6,65$ относительных единиц, *или*

- $dCt > 6,65$ относительных единиц и наличие амплификации химерного онкогена TMPSSR2-ERG.

Низкая вероятность положительного результата биопсии:

- $dCt > 6,65$ относительных единиц.

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

5.1. Неправильный забор, транспортировка и хранение биологического материала.

Устранение: соблюдать правила забора, транспортировки и хранения биологического материала.

5.2. Использование реагентов с истекшим сроком годности или реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: не использовать реагенты с истекшим сроком годности и соблюдать условия их хранения.

5.4. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т.д.).

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.