



УКРАЇНА

(19) UA (11) 49246 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 1/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИЛУЧЕННЯ ДНК З АРХІВНОГО ГІСТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ, ЯКИЙ ПОМІЩЕНИЙ В ПАРАФІН

1

(21) u200910659

(22) 22.10.2009

(24) 26.04.2010

(46) 26.04.2010, Бюл.№ 8, 2010 р.

(72) ГОРОВЕНКО НАТАЛІЯ ГРИГОРІВНА, ДОВЖЕНКО СВІТЛАНА ПЕТРІВНА, РОССОХА ЗОЯ ІВАНІВНА, ПОДОЛЬСЬКА СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ АМН УКРАЇНИ"

2

(57) Спосіб вилучення ДНК з архівного гістологічного матеріалу, який заключений в парафін, що включає теплову обробку гістологічного матеріалу, який **відрізняється** тим, що застосовують нагрівання зразка в розчині лізуючого буфера з гуанідинтіоціанатом протягом 12 год., проводять центрифугування при 4000 об./хв. та охолодження на льоду і видалення парафіну, з подальшою депротеїнізацією та зупинкою реакції при 80 °С, виділяють ДНК методом нуклеосорбції.

Корисна модель відноситься до медицини, а зокрема молекулярної діагностики, і може застосовуватись для вилучення ДОК з архівного гістологічного матеріалу, який заключений в парафін, для подальшого використання в молекулярно-генетичних дослідженнях.

На сьогоднішній день методи, які існують для вилучення нуклеїнових кислот з клінічного архівного матеріалу, що заключений в парафін, не дозволяють отримати велику кількість фрагментів ДНК, придатних для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Відомий спосіб депарафінізації клінічного матеріалу полягає в тому, що парафінові зрізи товщиною 5-15 мкм переносять в мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл, додають 1 мл органічного розчинника (ксилол, октан), струшують та залишають при кімнатній температурі на 2 хв. Пробірку з розчином центрифугують (12000 об./хв. протягом 5 хв.), видаляють верхню фазу з розчинним парафіном, осад двічі промивають 95-100 % етанолом, центрифугують при 12000 об./хв. 5 хв. після кожного відмивання етанолом. Надалі тканину висушують протягом 30 хв. (інколи більше) та використовують для виділення ДНК [1].

Недоліками даного способу є: застосування органічних розчинників, які знижують вихід виділеної ДОК, необхідність облаштування в молекулярно-генетичній лабораторії робочого місця, пристосованого для роботи з органічними розчинниками.

За прототип взято спосіб, який полягає у вилученні архівного гістологічного матеріалу, заключе-

ного в парафін, після прогрівання зразка в мікрохвильовій печі. В мікроцентрифужну пробірку зі зрізом додають буферний розчин (трис-НСІ, рН 9; 0,5 % tween-20), струшують і переносять в мікрохвильову піч, нагрівають 45-60 сек. при потужності 650 W, додають 1 мл ксилолу і залишають на 30 хв. [2]. Потім виконують стандартні процедури за протоколом виділення ДНК.

Проте і цей спосіб має свої недоліки: зниження ефективності виділення ДНК з архівного гістологічного матеріалу внаслідок плавлення в мікрохвильовій печі, необхідність облаштування в молекулярно-генетичній лабораторії робочого місця, пристосованого для використання органічних розчинників, вплив розчинників на здоров'я персоналу.

В основу даної корисної моделі поставлено завдання удосконалення способу вилучення ДНК з архівного гістологічного матеріалу, який заключений в парафін шляхом його температурної обробки та охолодження без застосування органічних розчинників, що дозволить вилучити тканини з парафінового зрізу, не спричиняючи значних ушкоджень біологічного матеріалу. Спосіб не потребує додаткового облаштування робочого місця та не впливає на здоров'я персоналу.

Поставлене завдання досягається тим, що в способі, який включає теплову обробку гістологічного матеріалу, згідно з даною корисною моделлю, застосовують нагрівання зразка в розчині лізуючого буфера з гуанідинтіоціанатом протягом 12 год., проводять центрифугування при 4000 об./хв та

UA (11) 49246 (13) U

охлаждения на льду і видалення парафіну, з подальшою депротейнізацією та зупинкою реакції при 80 °С, виділяють ДНК методом нуклеосорбції.

До даного рішення автори прийшли досліджуючи тканини архівного гістологічного матеріалу пухлин молочної залози, який заключений в парафін. Доведено, що застосування лізуючого буферу з гуанідинтіоціанатом при температурі 65 °С протягом 12 год та центрифугуванням при 4000 об/хв 10 хв. дозволяє розділити фракції та проводити екстракцію нуклеїнових кислот одночасно, без використання органічних розчинників.

Спосіб виконується наступним чином:

Досліджуваний зразок товщиною 10 мкм поміщають в мікроцентрифужну пробірку типу Епендорф об'ємом 1,5 мл. Додають 400 мкл розчину лізуючого буферу з гуанідинтіоціанатом (гуанідинтіоціанат – 18 г, дітіотрейтол – 95 мг, ЕДТА - 1мг - розчиняють в 30 мл дистильованої води) та витримують при температурі 65 °С 12 год. Під час експозиції, протягом останніх 2 год. зразки періодично, обережно струшують на вертексі. Одразу після термостатування зразки поміщають у центрифугу та центрифугують протягом 10 хв. при 4000 об/хв. Викладають зразки на лід на 7-10 хв. та видаляють парафін, що утворив пластинку над супернатантом. Далі проводять процес депротейнізації. Для цього додають розчин протеїнази К у розрахунку 500 мкг/мл 1 обережно струшують на вертексі. Поміщають у термостат та нагрівають 15 хв. при 37 °С. Зупиняють реакцію нагріванням при 80 °С 5 хв. і знову центрифугують 1хв. при 5000 об/хв.

Наступний процес нуклеосорбції проводять додаючи 25 мкл сорбенту (сілікагель) до зразка (супернатант). Струшують зразок на вертексі двічі з інтервалом 5 хв. і знову центрифугують 2 хв. при 5000 об/хв., надалі продовжують виділення нуклеїнових кислот набором для виділення ДНК.

Використання запропонованого способу, за результатами проведеної ПЛР з наступною детекцією ампліфікованих фрагментів методом електрофорезу в агарозному гелі, дозволяє підвищити ефективність виділення ДНК у порівнянні з вищезгаданими способами.

Таким чином, спосіб вилучення ДНК з архівного гістологічного матеріалу, який заключений в парафін, дозволяє проводити вилучення нуклеїнових кислот з парафінового зрізу без обробки органічними розчинниками, не спричиняє значних ушкоджень біологічного матеріалу, не впливає на здоров'я персоналу, не потребує додаткового обладнання робочого місця і пропонується до впровадження в роботу молекулярно-генетичних лабораторій, які проводять дослідження архівного матеріалу методом полімеразної ланцюгової реакції.

Література:

1. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под редакцией Херрингтон С., Макги Дж.-М. // «Мир» - 1999. - С.404-408.
2. Diaz-Cano SJ, DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA / Diaz-Cano SJ., Brady SP. // Diagn. Mol. Pathol. - 1997. - №6. - P.342-346.