



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 58444

(13) U

(51) МПК (2011.01)
G01N 33/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МУТАЦІЙ В ГЕНІ K-RAS У ХВОРИХ НА КОЛОРЕКТАЛЬНИЙ РАК

1

2

(21) u201011894

(22) 07.10.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ХРАНОВСЬКА НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА, СІТЬКО ВАЛЕНТИНА ВІТАЛІЙВНА, СВЕРГУН НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА, СКАЧКОВА ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ

(57) Спосіб визначення мутацій в гені K-ras у хворих на колоректальний рак, що включає виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти з біологічного матеріалу та проведення ампліфікації досліджуваної ділянки методом полімеразної ланцюгової реакції, який **відрізняється** тим, що визначення точкових мутацій гена проводять в один етап з використанням специфічних праймерів та флуоресцентних зондів з детекцією результатів в режимі реального часу.

Заявка відноситься до експериментальної медицини, а саме - онкології і може бути використана для прогнозування відповіді на анти-EGFR (Epidermal Growth Factor-Receptor) терапію у хворих на колоректальний рак.

Відомо, що до перетворення нормальної клітини в злоякісну відбувається накопичування тисяч випадкових дефектів в генах (мутацій). Особливу увагу до себе привертають трансформуючі гени родини Ras, які розміщені в короткому плечі 12 хромосоми (K-ras) і хромосоми 1 (N-ras). Мутації цих генів виявляють в 40 % карцином товстої кишки, сечового міхура, аденокарцином щитовидної залози, легені, 90 % карцином підшлункової залози [1], [2].

K-ras являє собою G-білок сигнального каскаду EGFR, так як саме він передає сигнал з рецептору епідермального фактору росту на поверхні клітини до механізму транскрипції в ядрі. K-ras переходить із неактивного в активний стан вивільнюючи ГДФ і зв'язуючи ГТФ. Активується після прикріплення EGF до EGFR, та передає сигнали росту клітині [3].

Ген K-ras може бути нормального (дикого) або мутантного типу. При нормальному фізіологічному сигнальному процесі активований K-ras самостійно виключається. Мутації ж блокують K-ras в активному стані, що приводить до постійної, неконтрольованої передачі сигналу і росту, навіть, без стимуляції EGFR. Як наслідок, це приводить до неконтрольованої проліферації і метастазування пухлини. Тому, онкологічним хворим з диким типом гену K-ras анти-EGFR лікування принесє бі-

льше користі, ніж хворим з мутаціями вказаного гену, так як відповідь на лікування не буде аналогічною.

Тому, статус мутації в гені K-ras є чітким прогностичним фактором відповіді на анти-EGFR терапію хворим на злоякісні новоутворення [4], [5].

За прототип нами обрано спосіб визначення K-ras-мутацій в парааортальних лімфовузлах і їх прогностичного значення після хірургічного лікування раку підшлункової залози [Виявление K-ras-мутацій в парааортальных лимфоузлах и их прогностическое значение после хирургического лечения рака поджелудочной железы / Б. А. Агаев, Г. Ф. Муслимов, В. Ш. Ягублу, Н. Р. Бабаева // Хирургия. - 2008. - № 9. - С. 64 - 69], де досліджують мутації в гені K-ras у хворих на підшлункову залозу з метою оцінки їх діагностичної та прогностичної значимості за допомогою методу визначення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Проведення аналізу включає такі етапи: виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) з біологічного матеріалу, ампліфікація досліджуваної ділянки методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням специфічних праймерів, розщеплення продуктів ампліфікації за допомогою відповідних ендонуклеаз рестрикції, детекція продуктів реакції методом гелелектрофорезу.

Позитивним в прототипі є те, що метод визначення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів є надійним молекулярно-генетичним методом дослідження, який дозволяє виявляти точкові мутації генів.

(19) UA (11) 58444 (13) U

Недоліком прототипу є те, що метод визначення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів є тривалим, багатостадійним процесом, що підвищує імовірність контамінації зразків.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення мутацій в гені K-ras у хворих на колоректальний рак шляхом дослідження наявності точкових мутацій: K12-4 VALINE, K12-5 ASPARTATE, K12-6 ALANINE, K13 ASPARTATE, K12 CYSTEINE, K12-2 SERINE, K12-3 ARGININE в пухлинній тканині та в парафінізованих зразках пухлини за допомогою методу ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу, що дасть можливість прогнозувати відповідь на анти-EGFR терапію у хворих на колоректальний рак.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

У хворих беруть після операційний матеріал - пухлинну тканину поміщену в RNA-later або зафіксовану в парафіні. Для визначення наявності мутації в гені K-ras з пухлинного матеріалу виділяють геномну ДНК. Виділення ДНК з парафінових блоків потребує етапу депарафінізації.

ДНК з пухлинної тканини, фіксованої в парафіні виділяють за допомогою колонок "QIAamp DNA Mini Kit" фірми "QIAGEN" (США), згідно рекомендації фірми-виробника.

Хід методики виділення ДНК:

Покласти невеликий шматок фіксованого в парафіні зразку тканини (вагою не більше 25 мг) в пробірки об'ємом 1,5-2 мл. Пробірки відповідно маркують.

- Додають 1200 мкл ксилену. Інтенсивно перемішують на вортексі. Прогрівають 5 хв при температурі 50°C.

- Центрифугують на максимальних обертах (13000 об/хв) протягом 3 хв при кімнатній температурі.

- Обережно відбирають супернатант за допомогою вакуумного відсмоктувача. Надалі працюють з осадом.

- До осаду додають 1200 мкл етанолу (96-100 %) і обережно перемішують на вортексі.

- Центрифугують на максимальних обертах (13000 об/хв) протягом 3 хв при кімнатній температурі.

- Обережно відбирають етанол за допомогою вакуумного відсмоктувача.

- Повторюють пункти 5-6.

- Пробірки з відкритими кришками поміщують в термостат на 15-20 хв при 40-45°C, потім на 20-40 хв при 37-40°C, потім залишають ще на 15-45 хв при кімнатній температурі (до повного випарування етанолу).

- Осад ресуспендують у 180 мкл буфера ATL.

- Додають 20 мкл протеїнази К. Перемішують на вортексі.

- Інкують пробірки в термостаті при температурі 56 °C 20-30 хв, періодично перемішуючи на вортексі.

- Додають в пробірки по 16 мкл РНКаз. Перемішують на вортексі 15 сек.

- Залишають на 2 хв при кімнатній температурі.

- Центрифугують 5 сек на мікроцентрифузі (5000об/хв.), щоб забрати краплі з кришки пробірки.

- Додають 200 мкл розчину AL. Перемішують на вортексі.

- Інкують пробірки в термостаті при температурі 70 °C протягом 10 хв.

- Ще раз перемішують на вортексі і центрифугують 5 сек при 5000 об/хв, щоб забрати краплі з кришки пробірки.

- Додають 200 мкл 96 %-го розчину етанолу. Перемішують на вортексі, центрифугують 5 сек при 5000 об/хв.

- Всю суміш переносять з 1,5 мл пробірки в 2 мл пробірку з фільтром (колонку). Суміш в колонку вносять, не зачіпаючи країв пробірки.

- Центрифугують при 9000 об/хв 1 хв.

- Змінюють піддон. Центрифугують 1 хв при 8000 об/хв. Змінюють піддон.

- Додають 500 мкл розчину AW-1. Центрифугують 1 хв при 9000 об/хв. Змінюють піддон.

- Додають 500 мкл розчину AW-2. Центрифугують 3 хв при 13000 об/хв. Змінюють піддон на 1,5 мл пробірку.

- Додають 200 мкл розчину AE. Інкують 5 хв при кімнатній температурі.

- Центрифугують 1 хв при 9000 об/хв. У 200 мл елюенту міститься необхідна кількість ДНК/РНК.

Зразок ДНК готовий до постановки полімеразної ланцюгової реакції. ДНК можна зберігати впродовж 7 днів при 2-8 °C, впродовж 1 року при - 20 °C та довготривало при - 70 °C.

Концентрацію отриманої ДНК вимірюють методом спектрофотометрії на спектрофотометрі Nanodrop 1000, фірми «Thermo Scientific», США.

Контроль якості отриманої ДНК проводять на основі визначення експресії гену β-актину, який є "house-keeping" геном, що в нормі експресується в кожній клітині. Для цього проводять реакцію ампліфікації з детекцією результатів в режимі реального часу з використанням приладу для Real-Time PCR та праймерів і зонду:

B-actin:

Прямий праймер-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A Зворотний праймер - CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G Зонд - 6-FAM-ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT-TAMRA

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містить 1-10 нг геномної ДНК, 0,3 мкМ прямого праймеру, 0,3 мкМ зворотного праймеру, 0,2 мкМ зонду, 12,5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

Використовують такий температурний режим: початок ампліфікації при 95 °C - 10 хв, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 45 циклів: 95 °C - 15 сек і 60 °C - 1 хв. Після закінчення реакції ампліфікації проводять облік одержаних результатів в режимі реального часу згідно рекомендацій фірми-виробника приладу.

Для проведення реакції ампліфікації фрагментів гену K-ras використовують праймери та зонди фірми «Applied Biosystems», США:

Праймери/зонди	Послідовність олігонуклеотидів (5'- 3')
TaqMan зонд 1	VIC-CTA CCA CAA GTT TAT ATT CAG TCA TTT TCA -TAMRA
Прямий праймер А	GTA CTG GTG GAG TAT TTG ATA GTG TAT TAA CC
K12-4VALINE(G12V)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TA
K12-5 ASPARTATE (G12D)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TT
K12-6ALANINE (G12A)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TG
K13 ASPARTATE (G13D)	CGT GTA TCG TCA AGG CAC TCT TGC CTA CCT

Праймери/зонди	Послідовність олігонуклеотидів (5'- 3')
TaqMan зонд 2	FAM - CAA TAMRA GAG TGC CTT GAC GAT ACA GCT A -
Прямий праймер В	CTC ATG AAA ATG GTC AGA GAA ACC TTT ATC
K12CYSTEINE(G12C)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CAT
K12-2SERINE(G12S)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CCA
K12-3 ARGININE (G12R)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CCC

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містить:

А) 1-10 нг геномної ДНК, 1,0 мкМ прямого праймеру А, 1,0 мкМ зворотного праймеру (G12V/G12D/G12A/G13D), 0,2 мкМ зонду 1, 12,5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

В) 1-10 нг геномної ДНК, 1,0 мкМ прямого праймеру В, 1,0 мкМ зворотного праймеру (G12C/G12S/G12R), 0,2 мкМ зонду 2, 12,5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

Реакцію ампліфікації проводять на приладі ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу (7300/7500 Real-Time PCR Systems фірми "Applied Biosystems", США) і використовують такий температурний режим: початок ампліфікації при 95 °C - 10 хв, накопичення ампліфікаційного продукту на протязі 50 циклів, 95 °C - 41 сек, 60 °C - 42 сек і 72 °C - 52 сек.

Після закінчення реакції ампліфікації проводять облік одержаних результатів в режимі реального часу згідно рекомендацій фірми-виробника приладу.

Переконаливими прикладами ефективності запропонованого способу є представлені аналізи двох хворих.

І. Хвора Н.А.І. 1950 р. н. (історія хвороби № 10678) перебувала у відділенні абдомінальної онкології з діагнозом карцинома сигмовидної кишки рT₄N₁M₁ ПГЗ № 35542-48/08 - помірно диференційована аденокарцинома кишки, метастази в регіонарні лімфовузли; проведено операцію паліативна резекція сигмовидної кишки. Через 3 неділі після операції назначено першу лінію хіміотерапії в режимі XELOX (капецитабін 1000 мг/м² дні 1-14, 21-35 + оксалиплатін 130 мг/м² дні 1, 21) + бевацизумаб 5мг/кг. Після трьох циклів терапії відповідно до критеріїв RECIST виявлено прогресію захворювання в печінці (за даними комп'ютерної томографії). В рамках проведення рандомізованого дослідження хворій в ЦБКГ (Центральний воєнний клінічний госпіталь) назначено другу лінію хіміотерапії в режимі FOLFIRI кожні дві неділі (фолінат кальцію 400 мг/м²; день 1, 5-фторурацил 2800 мг/м² інфузія 46 год, день 1,2; іринотекан 180 мг/м² день 1). Хвора отримала 16 курсів терапії. За даними комп'ютерної томографії відповідно до кри-

теріїв RECIST спостерігається часткова регресія метастазів в печінку.

Для проведення аналізу використовували пухлинну тканину зафіксовану в парафіні. Для визначення наявності мутації в гені K-ras з пухлинного матеріалу виділяли геномну ДНК.

ДНК з пухлинної тканини, зафіксованої в парафіні виділяли за допомогою колонок "QIAamp DNA Mini Kit" фірми "QIAGEN" (США), згідно рекомендації фірми-виробника.

Невеликий шматок зафіксованого в парафіні зразку пухлинної тканини (вагою не більше 25 мг) поміщали в 1,5-2мл пробірки. Пробірки відповідно маркерували. Додавали 1200 мкл ксилену. Інтенсивно перемішували на вортексі. Прогрівали 5 хв при температурі 50 °C. Центрифугували на максимальних обертах (13000 об/хв) протягом 3 хв при кімнатній температурі. Обережно відбирали супернатант за допомогою вакуумного відсмоктувача. Надалі працювали з осадом. До осаду додавали 1200 мкл етанолу (96-100 %) і обережно перемішували на вортексі. Центрифугували на максимальних обертах (13000 об/хв) протягом 3 хв при кімнатній температурі. Обережно відбирали етанол за допомогою вакуумного відсмоктувача. До осаду повторно додавали 1200 мкл етанолу (96-100 %) і обережно перемішували на вортексі. Центрифугували на максимальних обертах (13000 об/хв) протягом 3 хв при кімнатній температурі. Обережно відбирали етанол за допомогою вакуумного відсмоктувача. Пробірки з відкритими кришками поміщали в термостат на 15-20 хв при 40-45 °C, потім на 20-40 хв при 37-40 °C, потім залишали ще на 15-45 хв при кімнатній температурі (до повного випарування етанолу). Осад ресуспендували у 180 мкл буфера ATL. Додавали 20 мкл протеїнази К. Перемішували на вортексі. Інкубували пробірки в термостаті при температурі 56 °C 20-30 хв, періодично перемішували на вортексі. Додавали в пробірки по 16 мкл РНКаз. Перемішували на вортексі 15 сек. Залишали на 2 хв при кімнатній температурі. Центрифугували 5 сек на мікроцентрифузі (5000об/хв.), щоб забрати краплі з кришки пробірки. Додавали 200 мкл розчину AL. Перемішували на вортексі. Інкубували пробірки в термостаті при температурі 70 °C протягом 10 хв. Ще раз перемішували на вортексі і центрифугували 5 сек

при 5000 об/хв, щоб забрати краплі з кришки пробірки. Додавали 200 мкл 96 %-го розчину етанолу. Перемішували на вортексі, центрифугували 5 сек при 5000 об/хв. Всю суміш переносили з 1,5 мл пробірки в 2 мл пробірку з фільтром (колонку). Суміш в колонку вносили, не зачіпаючи країв пробірки. Центрифугували при 9000 об/хв. 1 хвилину. Змінювали піддон. Центрифугували 1 хв при 8000 об/хв. Змінювали піддон. Додавали 500 мкл розчину AW-1. Центрифугували 1 хв при 9000 об/хв. Змінювали піддон. Додавали 500 мкл розчину AW-2. Центрифугували 3 хв при 13000 об/хв. Змінювали піддон на 1,5 мл пробірку. Додавали 200 мкл розчину АЕ. Інкубували 5 хв при кімнатній температурі. Центрифугували 1 хв при 9000 об/хв. У 200 мл елюенту міститься необхідна кількість ДНК/РНК. Зразок ДНК готовий до постановки полімеразної ланцюгової реакції.

Концентрацію отриманої ДНК вимірювали методом спектрофотометрії на спектрофотометрі Nanodrop 1000, фірми «Thermo Scientific», США.

Контроль якості отриманої ДНК проводили на основі визначення експресії гену β-актину, який є "house-keeping" геном, що в нормі експресується в

кожній клітині. Для цього проводили реакцію ампліфікації з детекцією результатів в режимі реального часу з використанням приладу для Real-Time PCR та праймерів і зонду:

B-actin:

Прямий праймер-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A Зворотний праймер - CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G Зонд - 6-FAM-ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT-TAMRA

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 1-10 нг геномної ДНК, 0.3 мкМ прямого праймеру, 0.3 мкМ зворотного праймеру, 0.2 мкМ зонду, 12.5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

Використовували такий температурний режим: початок ампліфікації при 95 °C - 10 хвилин, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 45 циклів: 95 °C - 15 секунд і 60 °C - 1 хвилина. Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів в режимі реального часу згідно рекомендацій фірми-виробника приладу.

Для проведення реакції ампліфікації фрагментів гену K-ras використовували праймери та зонди фірми «Applied Biosystems», США:

Праймери/зонди	Послідовність олігонуклеотидів (5'-3')
TaqMan зонд 1	VIC-CTA CCA CAA GTT TAT ATT CAG TCA TTT TCA -TAMRA
Прямий праймер А	GTA CTG GTG GAG TAT TTG ATA GTG TAT TAA CC
K12-4 VALINE (G12V)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TA
K12-5 ASPARTATE (G12D)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TT
K12-6 ALANINE (G12A)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TG
K13 ASPARTATE (G13D)	CGT GTA TCG TCA AGG CAC TCT TGC CTA CCT

Праймери/зонди	Послідовність олігонуклеотидів (5'-3')
TaqMan зонд 2	FAM - CAA TAMRA GAG TGC CTT GAC GAT ACA GCT A -
Прямий праймер В	CTC ATG AAA ATG TC AGA GAA ACC TTT ATC
K12 CYSTEINE (G12C)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CAT
K12-2 SERINE (G12S)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CCA
K12-3 ARGININE (G12R)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CCC

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила:

А) 1-10 нг геномної ДНК, 1,0 мкМ прямого праймеру А, 1,0 мкМ зворотного праймеру (G12V/G12D/G12A/G13D), 0,2 мкМ зонду 1, 12,5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

В) 1-10 нг геномної ДНК, 1,0 мкМ прямого праймеру В, 1,0 мкМ зворотного праймеру (G12C/G12S/G12R), 0,2 мкМ зонду 2, 12,5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

Реакцію ампліфікації проводили на приладі ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу (7300/7500 Real-Time PCR Systems фірми "Applied Biosystems", США) і використовували такий температурний режим: початок ампліфікації при 95 °C - 10 хвилин, накопичення ампліфікаційного продукту на протязі 50 циклів, 95 °C - 41 секунда, 60 °C - 42 секунди і 72 °C - 52 секунди.

Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів в режимі реального часу згідно рекомендацій фірми-виробника приладу.

В результаті досліджень у хворій виявлено мутацію G12V (валін) в гені K-ras.

II. Хворий Є.А.К. 1966 р. н. (історія хвороби № 9166) перебував у відділенні абдомінальної онкології з діагнозом карцинома ректосигмовидного відділу товстої кишки рT₃N₁M₁ ПГЗ № 30127-31/09 - низької диференційована аденокарцинома кишки, метастази в регіонарні лімфовузли; проведено операцію паліативна резекція сигмовидної кишки. Через 3 неділі після операції назначено першу лінію хіміотерапії в режимі XELOX (капецитабін 1000 мг/м² дні 1-14, 21-35 +оксалиплатін 130 мг/м² дні 1, 21) + цетуксімаб початкова доза 400 мг/м², наступні - 250 мг/м кожні 7 днів. Після трьох циклів терапії відповідно до критеріїв RECIST виявлено стабілізацію захворювання в печінці (за даними комп'ютерної томографії). За даними комп'ютерної томографії відповідно до критеріїв RECIST спостерігалась регресія метастазів в печінці.

Для проведення аналізу використовували пухлинну тканину зафіксовану в парафіні. Для визначення наявності мутації в гені K-ras з пухлинного матеріалу виділяли геномну ДНК.

ДНК з пухлинної тканини, зафіксованої в парафіні виділяли за допомогою колонок "QIAamp DNA Mini Kit" фірми "QIAGEN" (США), згідно рекомендації фірми-виробника.

Невеликий шматок зафіксованого в парафіні зразку пухлинної тканини (вагою не більше 25 мг) поміщали в 1,5-2мл пробірки. Пробірки відповідно маркерували. Додавали 1200 мкл ксилену. Інтенсивно перемішували на вортексі. Прогрівали 5 хв при температурі 50 °С. Центрифугували на максимальних обертах (13000 об/хв) протягом 3 хв при кімнатній температурі. Обережно відбирали супернатант за допомогою вакуумного відсмоктувача. Надалі працювали з осадом. До осаду додавали 1200 мкл етанолу (96-100 %) і обережно перемішували на вортексі. Центрифугували на максимальних обертах (13000 об/хв) протягом 3 хв при кімнатній температурі. Обережно відбирали етанол за допомогою вакуумного відсмоктувача. До осаду повторно додавали 1200 мкл етанолу (96-100 %) і обережно перемішували на вортексі. Центрифугували на максимальних обертах (13000 об/хв) протягом 3 хв при кімнатній температурі. Обережно відбирали етанол за допомогою вакуумного відсмоктувача. Пробірки з відкритими кришками поміщали в термостат на 15-20 хв при 40-45 °С, потім на 20-40 хв при 37-40 °С, потім залишали ще на 15-45 хв при кімнатній температурі (до повного випарування етанолу). Осад ресуспендували у 180 мкл буфера ATL. Додавали 20 мкл протеїнази К. Перемішували на вортексі. Інкубували пробірки в термостаті при температурі 56 °С 20-30 хв, періодично перемішували на вортексі. Додавали в пробірки по 16 мкл РНКаз. Перемішували на вортексі 15 сек. Залишали на 2 хв при кімнатній температурі. Центрифугували 5 сек на мікроцентрифузі (5000об/хв.), щоб забрати краплі з кришки пробірки. Додавали 200 мкл розчину AL. Перемішували на вортексі. Інкубували пробірки в термостаті при температурі 70 °С протягом 10 хв. Ще раз перемішували на вортексі і центрифугували 5 сек при 5000 об/хв, щоб забрати краплі з кришки пробірки. Додавали 200 мкл 96 %-го розчину етанолу. Перемішували на вортексі, центрифугували 5 сек при 5000 об/хв. Всю суміш переносили з 1,5 мл

пробірки в 2 мл пробірку з фільтром (колонку). Суміш в колонку вносили, не зачіпаючи країв пробірки. Центрифугували при 9000 об/хв. 1 хвилину. Змінювали піддон. Центрифугували 1 хв при 8000 об/хв. Змінювали піддон. Додавали 500 мкл розчину AW-1. Центрифугували 1 хв при 9000 об/хв. Змінювали піддон. Додавали 500 мкл розчину AW-2. Центрифугували 3 хв при 13000 об/хв. Змінювали піддон на 1,5 мл пробірку. Додавали 200 мкл розчину АЕ. Інкубували 5 хв при кімнатній температурі. Центрифугували 1 хв при 9000 об/хв. У 200 мл елюенту міститься необхідна кількість ДНК/РНК. Зразок ДНК готовий до постановки полімеразної ланцюгової реакції.

Концентрацію отриманої ДНК вимірювали методом спектрофотометрії на спектрофотометрі Nanodrop 1000, фірми «Thermo Scientific», США.

Контроль якості отриманої ДНК проводили на основі визначення експресії гену Р-актину, який є "house-keeping" геном, що в нормі експресується в кожній клітині. Для цього проводили реакцію ампліфікації з детекцією результатів в режимі реального часу з використанням приладу для Real-Time PCR та праймерів і зонду:

B-actin:

Прямий праймер-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A Зворотний праймер - CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G Зонд - 6-FAM-ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC QT-TAMRA

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 1-10 нг геномної ДНК, 0,3 мкМ прямого праймеру, 0,3 мкМ зворотного праймеру, 0,2 мкМ зонду, 12,5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

Використовували такий температурний режим: початок ампліфікації при 95°C - 10 хв, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 45 циклів: 95°C - 15 сек і 60°C - 1 хв. Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів в режимі реального часу згідно рекомендацій фірми-виробника приладу.

Для проведення реакції ампліфікації фрагментів гену K-ras використовували праймери та зонди фірми «Applied Biosystems», США:

Праймери/зонди	Послідовність олігонуклеотидів (5' - 3')
TaqMan зонд 1	VIC-CTA CCA CAA GTT TAT ATT CAG TCA TTT TCA -TAMRA
Прямий праймер А	GTA CTG GTG GAG TAT TTG ATA GTG TAT TAA CC
K12-4VALINE(G12V)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TA
K12-5 ASPARTATE (G12D)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TT
K12-6 ALANINE (G12A)	TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC TG
K13 ASPARTATE (G13D)	CGT GTA TCG TCA AGG CAC TCT TGC CTA CCT

Праймери/зонди	Послідовність олігонуклеотидів (5' -3')
TaqMan зонд 2	FAM - CAA TAMRA GAG TGC CTT GAC GAT ACA GCT A -
Прямий праймер В	CTC ATG AAA ATG GTC AGA GAA ACC TTT ATC
K12CYSTEINE(G12C)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CAT
K12-2 SERINE (G12S)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CCA
K12-3 ARGININE (G12R)	CTG AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CCC

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила:

А) 1-10 нг геномної ДНК, 1,0 мкМ прямого праймеру А, 1,0 мкМ зворотного праймеру (G12V/G12D/G12A/G13D), 0,2 мкМ зонду 1, 12,5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

В) 1-10 нг геномної ДНК, 1,0 мкМ прямого праймеру В, 1,0 мкМ зворотного праймеру (G12C/G12S/G12R), 0,2 мкМ зонду 2, 12,5 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix ("Applied Biosystems", США).

Реакцію ампліфікації проводили на приладі ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу (7300/7500 Real-Time PCR Systems фірми "Applied Biosystems", США) і використовували такий температурний режим: початок ампліфікації при 95 °С - 10 хв, накопичення ампліфікаційного продукту на протязі 50 циклів, 95 °С - 41 сек, 60 °С - 42 сек і 72 °С - 52 сек.

Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів в режимі реального часу згідно рекомендацій фірми-виробника приладу.

В результаті досліджень у хворого не виявлено мутацій в гені K-ras.

Таким чином, наявність мутації в гені K-ras - є чітким прогностичним фактором відповіді на анти-EGFR терапію у хворих на колоректальний рак.

Джерела інформації:

1. Анализ соматических K-ras мутаций в полипах толстой кишки / М. А. Сазанова, Ю. Е. Ваганов, Е. Л. Корчагина [и др.] // Медицинская генетика. - 2005. - Т. 4. - С. 263.

2. Cancer Genome Project. BRAF and K-RAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas / Chan T.L., Zhao W., Leung S.Y. [et al.] // Cancer Res. - 2003. - Vol. 63. - P. 4878-4881.

3. p53 and K-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer / Bouzourene H., Gervaz P., Cerottini J. P. [and all.] // Eur. J. Cancer. - 2000. - Vol. 36. - № 4. - P. 1008-1015.

4. Doolittle B. R. detection of the mutated K-ras biomarker in colorectal carcinoma / Doolittle B. R., Emanuel J., Tuttle C // Exp. Moī. Pathol. -2001. - Vol. 70. - № 3. - P. 289-301.

5. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study / Brink M, de Goeij A. F., Weijenberg M. P. [et al.] // Carcinogenesis. - 2003. - Vol. 24. - № 4. - P. 703-710.

6. Выявление K-ras-мутаций в парааортальных лимфоузлах и их прогностическое значение после хирургического лечения рака поджелудочной железы / Б. А. Агаев, Г. Ф. Муслимов, В. Ш. Ягублу, Н. Р. Бабаева // Хирургия. - 2008. - № 9. - С. 64 - 69 (прототип).