



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108736** (13) **U**
(51) МПК
C12N 15/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 01435	(72) Винахідник(и): Кузенко Євген Вікторович (UA), Романюк Анатолій Миколайович (UA), Линдін Микола Сергійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.02.2016	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2016, Бюл.№ 14	

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ (ДНК) З ПАРАФІНОВИХ ГІСТОЛОГІЧНИХ БЛОКІВ

(57) Реферат:

Спосіб виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) з парафінових гістологічних блоків включає отримання на мікротомі парафінізованих зрізів тканин із парафінізованого зразка тканин, підготовку їх гістологічним методом, депарафінізацію гістологічних зрізів, розділення розчину з ДНК шляхом центрифугування з наступним його виділенням. депарафінізацію підготовлених гістологічних зрізів здійснюють при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки зрізів тканин від парафіну із використанням ксилолу. На першому етапі відмивку ксилолом проводять протягом 5 хвилин. Потім розчин зливають і додають другу порцію ксилолу, де другий етап відмивки проводять протягом 10 хвилин. Після проведеної дворазової відмивки гістологічних зрізів ксилолом проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом впродовж 10 хвилин для кожної промивки, потім здійснюють відділення ДНК із тканин, використовуючи лізувальний буфер у вигляді 30 мМ TrisCl, 10 мМ EDTA, 1 % SDS, протеїнази-К. Сам процес проводять протягом 24 годин. При розділенні розчину з ДНК, що містить лізувальний буфер, ДНК попередньо додають до них суміш фенол-хлороформу у співвідношенні 1:1. Виділення ДНК проводять методом його переосаджування в охолоджуваному етиловому спирті.

UA 108736 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до патологічної анатомії та молекулярної біології, і може бути використана для генетичного аналізу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), інфрачервоної спектрофотометрії (ІЧ) та методу ДНК-фрагментації для визначення прогнозу перебігу хвороби та корегування лікування.

5 Відомий спосіб отримання ДНК для ПЛР із тканин пухлин, що включає відбір гістологічних парафінових зразків, з яких планується отримання ДНК, шляхом одержання з кожного зразка тканин на мікротомі 2-3-х зрізів товщиною 5-7 мікрон, які потім підготовлюються гістологічним методом, здійснюється депарафінізація гістологічних зрізів шляхом нагрівання до 60-62 °С протягом 30 хвилин, де біологічна тканина, яка досліджується, звільняється від парафіну. Далі розділяється розчин з ДНК та парафіну, здійснюється відокремлюванням цільового продукту, який містить розчин, ДНК та залишки гістологічних зрізів [патент України на КМ № 99734, МПК: C12N 15/00, 25.06.2015].

Даний спосіб є найбільш близьким по суті та результату, який досягається, тому і вибраний за прототип.

15 Недоліком прототипу є те, що депарафінізація гістологічних зрізів досягається нагріванням пробірок з матеріалом до 60-62 °С протягом 30 хвилин, що призводить до часткового руйнування та пошкодження ДНК.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити існуючий спосіб виділення ДНК з парафінових гістологічних блоків шляхом відмінностей при відмиванні зрізів тканин від парафіну, оптимізації режиму його відділення та виділення, що дозволить позбутися від залишків поліпептидів та ліпідів у цільовому продукті, нівелювати температурний вплив на спіраль ДНК, підвищуючи таким чином вихід якісної ДНК із досліджених об'єктів, і як результат ДНК виділяється без пошкоджень та в більшій кількості.

20 Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі виділення ДНК із парафінових гістологічних блоків, який включає отримання на мікротомі зрізів тканин із парафінізованого зразка тканин, підготовку їх гістологічним методом, депарафінізацію гістологічних зрізів з наступним розділенням розчину з ДНК шляхом центрифугування, та його відмиванням згідно із корисною моделлю, депарафінізацію підготовлених гістологічних зрізів здійснюють при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки зрізів тканин від парафіну із використанням ксилолу. При цьому на першому етапі відмивку ксилолом проводять 5 хвилин, потім розчин зливають і додають другу порцію ксилолу з проведенням цього етапу відмивки протягом 10 хвилин; після проведеної дворазової відмивки гістологічних зрізів ксилолом здійснюють двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом по 10 хвилин для кожної промивки. Для відділення ДНК із тканин використовують лізувальний буфер, за який застосовують 30 мМ TrisCl, 10 мМ EDTA, 1 % SDS, протеїназа-К і сам процес проводять протягом 24 годин.

35 При розділенні лізувального буфера та ДНК попередньо додають до них суміш фенол-хлороформ у співвідношенні 1:1 і виділення ДНК проводять методом його переосадження в охолодженому етанолі.

40 Отриманні на мікротомі парафінові зрізи тканин із парафінізованого зразка дають можливість проаналізувати банк зразків тканин патологоанатомічних бюро та селективно досліджувати ДНК пухлинних клітин, які можуть зберігатися у звичайних умовах досить тривалий час. Депарафінізація гістологічних зрізів з наступним відділенням ДНК проводиться при кімнатній температурі, що сприяло підвищенню виходу якісної ДНК, з парафінізованих тканин за рахунок відсутності розривів ДНК, які виникають під час нагрівання.

45 Окрім цього, проведення процесу виділення ДНК із тканин з використання вищезазначеного лізувального буфера, наступне його очищення та виділення при таких технологічних параметрах дозволяє позбавитися залишків поліпептидів та ліпідів, що також сприяє виходу якісної ДНК. Даний спосіб виділення ДНК виконується в кілька етапів.

50 1. Підготовчий етап. Проводиться відбір гістологічних парафінових зразків, з яких планується отримання ДНК. З кожного зразка тканин отримують на мікротомі 2-3 зрізи товщиною 5-7 мікрон, які переносять в пробірку "епендорф".

2. Етап депарафінізації підготовлених гістологічних зрізів. Додають ксилол 400 мкл, інкубують 5 хвилин, потім розчин зливають і додають другу порцію ксилолу 400 мкл, - інкубують 10 хвилин. Ксилол зливають та додають 400 мкл 96 % етилового спирту і інкубують протягом 10 хвилин, зливають, додають другу порцію етилового спирту 400 мкл, інкубують 10 хвилин.

55 3. Етап відділення ДНК із тканин. Використовують лізувальний буфер 500 мкл, за який застосовують 30 мМ TrisCl, 10 мМ EDTA, 1 % SDS, протеїназа-К і сам процес проводять протягом 24 годин.

4. Етап розділення лізувального буферу та ДНК. Додають до пробірки з лізувальним буфером та ДНК суміш фенол-хлороформу (1:1). Інкують 5 хвилин. Розділення проводять шляхом центрифугування при 12000 об./хв. 5 хвилин.

5. Етап виділення ДНК. Супернатант збирають та осаджують у 96 % охолоджену етиловому спирті.

Прикладом застосування запропонованого методу виділення ДНК із парафінізованих зрізів тканин людини, може бути робота по вивченню пошкодження ДНК в зразках тканин епулісу. Для дослідження було відібрано 56 гістологічних зразків епулісів, які зберігались в Сумському онкологічному диспансері та гістологічній лабораторії Сумського обласного патологоанатомічного бюро протягом 10 років з гістологічним діагнозом "Епуліс" (фіброзний, ангіоматозний, гігантоклітинний). З блоків отримали зрізи. З кожного зразка тканин нарізали на мікротомі 2-3 зрізи товщиною 5-7 мікрон, які переносили в пробірку "епендорф". Депарафінізацію підготовлених гістологічних зрізів проводили з додаванням ксилолу 400 мкл, інкубували 5 хвилин, потім розчин зливали і додавали другу порцію ксилолу 400 мкл та інкубували 10 хвилин. Ксилол зливали та додавали другу порцію етилового спирту і інкубували протягом 10 хвилин - зливали та додавали другу порцію етилового спирту 400 мкл і інкубували 10 хвилин. Для відділення ДНК з тканин використовували лізувальний буфер 500 мкл, за який застосовують 30 мМ TrisCl, 10 мМ EDTA, 1 % SDS, протеїназа-К і сам процес проводять протягом 24 годин. Додавали до пробірки з лізувальним буфером та ДНК суміш фенол-хлороформу (1:1). Інкубували 5 хвилин. Розділення проводили 5 хвилин шляхом центрифугування при 12000 об/хв. Супернатант збирали та осаджували у 96 % охолоджену етиловому спирті. Осад розчиняли в 30 мкл бідистильованої води і цей розчин, що містить ДНК, використовували для ПЛР. Концентрація ДНК (на спектрофотометрі) становила 365 нг/мкл (при виділенні ДНК за способом-прототипу, концентрація її становила близько 210 нг/мкл). З отриманої ДНК поставили ПЛР з праймерами до гена Beta-actin з використанням позитивного і негативного контролю. При аналізі ПЛР на електрофорезі в агарозному гелі виявили ампліфіковані фрагменти відповідного гена, що характеризує високу якість ДНК. Отриману при екстракції ДНК використовують в дослідницькій роботі, для визначення наявності гена бета-актину. Відомо, що в 100 % клітин людини Beta-actin бере участь в створенні цитоскелету.

Таким чином, як показує наведений приклад, спосіб, що заявляється, забезпечує високий вихід якісної ДНК (кількості ДНК досить для візуалізації у гелі), придатної для генетичного аналізу за допомогою ПЛР, проведення інфрачервоної спектрофотометрії та методу ДНК-фрагментації. Завдяки цьому, спосіб, що заявляється, можна реалізувати у звичайній гістологічній лабораторії для виділення ДНК із парафінових блоків.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) з парафінових гістологічних блоків, що включає отримання на мікротомі парафінізованих зрізів тканин із парафінізованого зразка тканин, підготовку їх гістологічним методом, депарафінізацію гістологічних зрізів, розділення розчину з ДНК шляхом центрифугування з наступним його виділенням, який **відрізняється** тим, що депарафінізацію підготовлених гістологічних зрізів здійснюють при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки зрізів тканин від парафіну із використанням ксилолу, при цьому на першому етапі відмивку ксилолом проводять протягом 5 хвилин, потім розчин зливають і додають другу порцію ксилолу, де другий етап відмивки проводять протягом 10 хвилин, після проведеної дворазової відмивки гістологічних зрізів ксилолом проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом впродовж 10 хвилин для кожної промивки, потім здійснюють відділення ДНК із тканин, використовуючи лізувальний буфер у вигляді 30 мМ TrisCl; 10 мМ EDTA; 1 % SDS; протеїнази-К, при цьому сам процес проводять протягом 24 годин, а при розділенні розчину з ДНК, що містить лізувальний буфер, ДНК попередньо додають до них суміш фенол-хлороформу у співвідношенні 1:1, і виділення ДНК проводять методом його переосаджування в охолоджену етиловому спирті.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601