

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

24.06.2011

Регистрационный № 007-0211

ДНК-ДИАГНОСТИКА ХОРЕИ ГЕНТИНГТОНА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр “Мать и дитя”», ГУ «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»

АВТОРЫ: О.А. Якуц, канд. биол. наук К.А. Моссэ, д-р мед. наук С.А. Лихачев, И.В. Плешко

Минск 2011

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлена ДНК-диагностика хореи Гентингтона путем идентификации экспансии tandemных тринуклеотидных повторов CAG в гене IT-15.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Молекулярно-генетический анализ должен проводиться пациентам с хореическим гиперкинезом, который проявляется непроизвольным гримасничаньем, усилением жестикуляции, размахиванием рук, дрожанием, пошатыванием при ходьбе и нейропсихическими нарушениями. При ювенильной форме болезни Гентингтона — в случае акинетико-ригидного синдрома в возрасте до 20 лет в сочетании с деменцией. Возможно наличие мозжечковой атаксии, пирамидной недостаточности, дистонических гиперкинезов, эпилептического синдрома.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Биологический материал

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Материалы и оборудование: программируемый нагревательный блок (амплификатор), миницентрифуга, пробирки объемом 1,5 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: Taq-полимераза, соответствующий 10X буфер для ПЦР, 25 мМ MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), праймеры, бидистиллированная деионизированная вода (H₂O).

Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании в автоматическом анализаторе используется меченый вариант праймера, имеющий молекулу «репортер» (6-FAM) на 5'-конце. Последовательность праймеров:

HD 482: 5' GGC TGA GGA AGC TGA GGA G 3'

HD 344: 5' FAM - CCT TCG AGT CCC TCA AGT CCT TC 3'

Проведение автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием

Материалы и оборудование: генетический анализатор с программным обеспечением, программируемый термостат, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: маркер молекулярного веса, деионизированный формамид, раствор полимера, 10X ЭДТА буфер, H₂O.

2. Методика определения экспансии tandemных тринуклеотидных повторов CAG в гене IT-15

Проведение ПЦР

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1xПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dGTP/dTTP, по 5 пМ праймеров и 1 единицу активности Taq полимеразы.

2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.

3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95°C. Затем выполняется 35 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 95°C, 1 мин. отжига при 62°C и 1 мин синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 5 мин при 72°C.

4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

Проведение автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием

Подготовку к работе генетического анализатора выполнить в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Подготовка проб:

1. В микропробирку добавить 0,7 мкл амплификата из каждой реакции, 0,7 мкл маркера молекулярного веса ROX350 и 8 мкл деионизированного формамида.

2. Пробы денатурировать 4 мин при 95°C.

3. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить во льду.

4. Установить микропробирки в штатив анализатора.

Анализ проб:

1. Поместить штатив с микропробирками в анализатор.

2. Задать необходимые параметры анализа в программе сбора данных.

3. Запустить программу сбора данных.

4. После окончания разделения образцов и сбора данных перенести результаты в программу анализа данных GeneScan.

5. Проанализировать полученные данные.

Интерпретация полученных данных

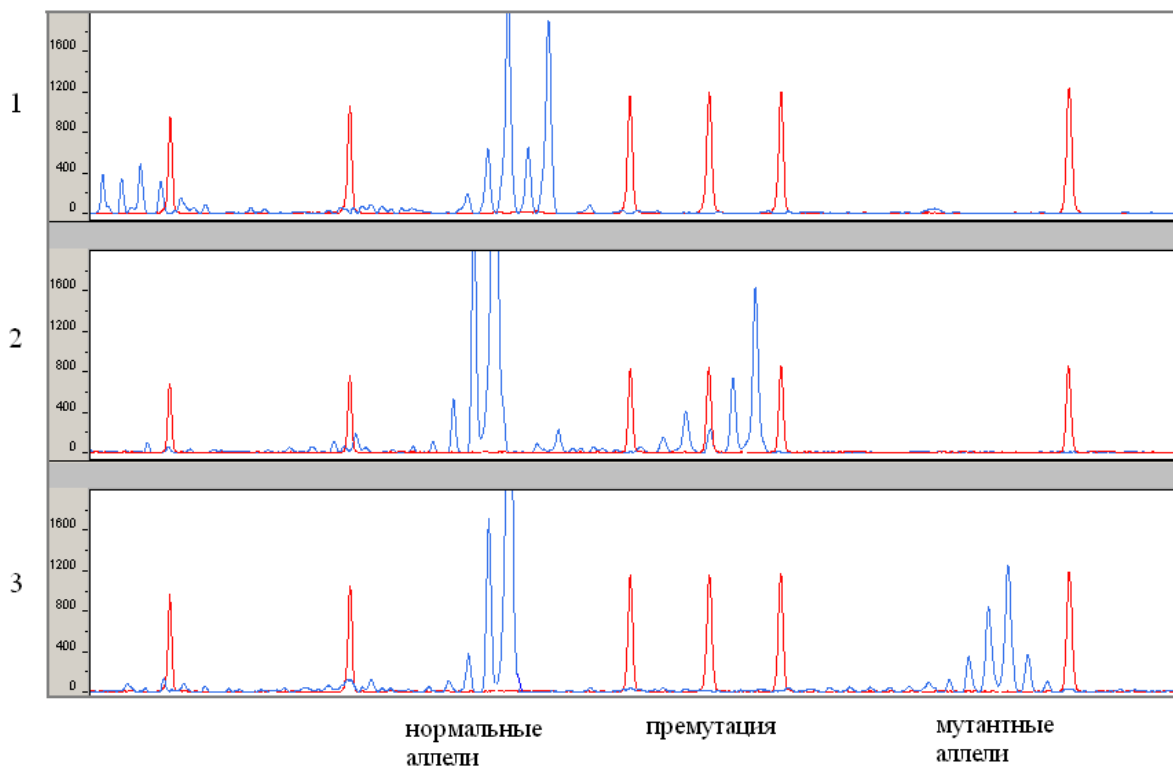
Определение аллелей проводить по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа (рисунок).

- ≤26 повторов — нормальные аллели;

- 27–35 повторов — промежуточные аллели. У индивида с таким числом повторов заболевание не развивается, но есть риск передачи своим детям аллеля с аномально увеличенным числом повторов;

- 36–39 повторов — аллели данного размера относятся к патологическим, однако пенетрантность заболевания при таком числе повторов меньше 100%, и фенотип хореи Гентингтона развивается не всегда. Подобные аллели являются исключительно редкими;

- ≥40 повторов — полная пенетрантность. Аллели данного размера являются молекулярной основой развития хореи Гентингтона.



1 — норма/норма; 2 — норма/премутация; 3 — норма/мутация

Рисунок — Варианты аллелей гена IT-15, обнаруженные в ходе исследования

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Для предотвращения диагностических ошибок надо соблюдать следующие правила:

- использовать только химически чистую и желательно стерильную посуду;
- после работы с каждым объектом инструмент и используемые поверхности лабораторных столов протирать этанолом;
- использовать одноразовые пробирки и наконечники для пипеток;
- стерилизовать применяемые растворы (если допустима их стерилизация) и хранить их разлитыми небольшими порциями;
- работать только с минимально необходимыми объемами растворов;
- перед открыванием крышек пробирок осаждать растворы со стенок центрифугированием;
- в каждую серию проб включать в качестве контроля пробирку с поэтапным внесением всех применяемых растворов, но без ДНК (отрицательный контроль);
- при выделении ДНК и постановке ПЦР лицо сотрудника должно быть защищено экраном либо маской, работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

В лаборатории необходимо выделять несколько зон:

- зона экстрагирования ДНК — в ней осуществляют все этапы обработки

биологического материала и выделения геномной ДНК;

- зона проведения ПЦР — предназначена для внесения в пробирки компонентов амплификационной смеси и ДНК, а также для проведения амплификации. В зонах экстрагирования ДНК и проведения ПЦР не следует открывать пробирки с продуктами амплификации, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне;

- зона анализа продуктов ПЦР — в ней проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.