

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

13.04.2012 г.

Регистрационный № 024-0212

**ДНК-ДИАГНОСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ
К ТРОМБОФИЛИЯМ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»,

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Кардиология»

АВТОРЫ:

Д-р. биол. наук, проф. Моссэ И.Б., д-р. мед. наук, проф. Полонецкий Л.З.,

канд. биол. наук Моссэ К.А., канд. биол. наук, доц. Морозик П.М., Гончар А.Л.,

Буко И.В., Амелянович М.Д.

Минск 2012

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота;
ЛПНП	липопротеины низкой плотности;
ПЦР	полимеразная цепная реакция;
ССЗ	сердечно-сосудистые заболевания
FI	первый фактор свертываемости крови
FII	второй фактор свертываемости крови
FV	пятый фактор свертываемости крови
FXIII	тринадцатый фактор свертываемости крови
PAI-1	ингибитор активатора плазминогена
LDLR	рецептор липопротеина низкой плотности
Thr	треонин
Ala	аланин
Val	валин
Leu	лейцин
п.н.	пары нуклеотидов
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
TEMED	тетраметилэтилендиамин
TBE	трис/борат/ЭДТА

Инструкция разработана с целью определения: генетической предрасположенности к тромбозированию кровеносных сосудов.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Медицинская генетика, кардиология.

ОПИСАНИЕ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ТРОМБОФИЛИЯМ

Показания к применению:

- пациентам, перенесшим ССЗ;
- пациентам, имеющим родственников с случаями инфаркта миокарда и других ССЗ;
- пациентам из группы риска.

Противопоказания к применению:

Противопоказаний к применению нет.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Для идентификации мутаций используется амплификация специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим разделением продуктов в полиакриламидном геле или с помощью автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

В качестве биологического материала для исследования используется ДНК из лейкоцитов периферической крови, высушенной на специальных бланках ФТА, которые не содержат химических агентов, способных ингибировать ПЦР.

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Реакция ПЦР для амплификации фрагментов генов

Оборудование и материалы:

1. ПЦР-бокс.
2. Программируемый нагревательный блок (амплификатор).
3. Миницентрифуга.
4. Автоматические пипетки переменного объема с одноразовыми сменными наконечниками.
5. Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл.
6. Пробирки объемом 1,5 мл.

Реактивы:

1. Таq полимераза.
2. Соответствующий 10× буфер для ПЦР.
3. 25 мМ MgCl₂.

4. Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).
5. Бидистиллированная деионизированная вода.
6. Праймеры, фланкирующие участки ДНК, содержащие анализируемые мутации (последовательность праймеров представлена в табл. 1).

Проведение ПЦР

Для определения мутаций в генах *FI*, *FII*, *FV*, *FXIII*, *PAI-1*, *LDLR* проводится полимеразная цепная реакция с использованием специфичных для каждого полиморфизма праймеров (табл.1).

Этапы метода:

1. Приготовить амплификационную смесь из расчета 20 мкл на образец. Смесь с конечным объемом 20 мкл (довести H₂O) содержит:
 - 1×ПЦР буфер для амплификации;
 - 2,0 mM MgCl₂;
 - 200 мкМ dNTP;
 - по 1 мкМ каждого праймера;
 - 1 ед. *Taq*-полимеразы.
2. В пробирки для ПЦР внести по 20 мкл амплификационной смеси.

Таблица 1

Последовательности праймеров

Ген	Полиморфизм	Нуклеотидная последовательность
<i>FI</i>	Thr312Ala	Fib-f 5'-CCTAGCAGTGCTGGAAGCTG-3' Fib-r 5'-GGCTCCCAGGGTTTTGGT-3'
<i>FII</i>	G20210A	РПЦ(G) 5'-CCCCTTTAACAACCGCTGGTATCCAG-3' РПЦ(A) 5'-TCACCCCATGAGACGATGCCAAT-3' РПЦ(1) 5'-TGGCAGGGGAATACTGATGTGACCTT-3' РПЦ(2) 5'-TGGCCCCCTACTCTCCAAACTGATC-3'
<i>FV</i>	1691 G>A	FVL(A) 5'-AGAGCAGATCCCCTGGACAGTCA-3' FVL(G) 5'-ACTTCAAGGACAAAATACCTGTATTCATC-3' FVL(1) 5'-AGTTC AACCAGGGGAAACCTATACTT-3' FVL(2) 5'-T TACTGTTCTCTTGAAGGAAATGCC-3'
<i>FXIII</i>	Val34Leu	V34L-FI: 5'-GACCTGCCACAGTGGAGCTTCAGGACT-3' V34L-RI: 5'-GGTTGACGCCCCGGGGCACTAC-3' V34L-FO: 5'-GTCAAAAATGTCAGAACTTCCAGGACCGCCTTT-3' V34L-RO: 5'-TGGACCCAGAGTGGTGGGGAAGGG-3'
<i>PAI-1</i>	4G/5G	PAI-IF: 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-FAM-3' PAI-IR: 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'
<i>LDLR</i>	ТА повторы 18 экзона	GZ7: 5'-FAM-CACCTTTGTATATTGGTTGAAACTGT-3' GZ8: 5'-CACTGAACAAATACAGCAACCAGGG-3'

3. Специального этапа выделения ДНК не требуется. Вместо этого для анализа ДНК с помощью панчера из бланков с кровью можно выбить диски диаметром

~ 1 мм² и поместить их в предварительно приготовленную амплификационную смесь.

4. Пробирки поместить в амплификатор и провести первоначальную денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95 °С. Индивидуальные температурно-временные условия для каждой мутации представлены в табл. 2;

Таблица 2

Условия амплификации

Полиморфизм	Амплификационный цикл			Количество циклов
	денатурация	отжиг	синтез	
FI Thr312Ala	95 °С, 30 с	63 °С, 30 с	72 °С, 20 с	30
FII G20210A	95 °С, 45 с	64 °С, 20 с	72 °С, 30 с	35
FVL G1691A	95 °С, 45 с	63 °С, 20 с	72 °С, 30 с	35
FXIII Val34Leu	95 °С, 1 мин	68 °С, 35 с	72 °С, 15 с	30
PAI-I 4G/5G	95 °С, 30 с	58 °С, 30 с	72 °С, 1 мин	30
LDLR (TA) n	95 °С, 30 с	54 °С, 30 с	72 °С, 40 с	30

5. На завершающей стадии синтеза пробирки выдержать 3 мин. при 72 °С;

6. После окончания ПЦР пробы поместить в холодильник.

Визуализация продуктов амплификации (электрофорез) и интерпретация результатов анализа генов FI, FII, FV, FXIII.

Оборудование и материалы:

1. Камера для вертикального электрофореза.
2. Стекла соответствующего размера (10×10).
3. Прокладки и гребенка толщиной 1,0 мм.
4. Источник постоянного тока.
5. Миницентрифуга.
6. УФ трансиллюминатор.
7. Камера для фотографирования гелей.
8. Кювета для окрашивания.
9. Микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы:

1. Бромфеноловый синий.
2. Ксиленианол.
3. 40% сахароза.
4. Акриламид;
5. N,N'-метиленбисакриламид.
6. Трис.
7. ЭДТА.
8. Борная кислота.
9. Персульфат аммония.
10. TEMED;
11. Маркер молекулярного веса 50–1000 bp.
12. H₂O.

Приготовление растворов:

1. 30%-й раствор полиакриламида (соотношение мономеров 29:1): 29 г акриламида, 1 г N,N'-метиленабисакриламида, H₂O до 100 мл;
2. 10× TBE буфер: 3,72 г ЭДТА, 27,5 г борной кислоты, 54 г триса, H₂O до 500 мл;
3. 10%-й персульфат аммония: 0,1 г персульфата, H₂O до 1 мл;
4. 6× буфер для нанесения проб: 0,25%-й бромфеноловый синий, 0,25%-й ксиленцианол, 40%-я сахароза.

Проведение электрофоретического разделения продуктов

1. Собрать камеру для заливки геля.
2. Приготовить гель.

Для приготовления 15 мл 8% геля с соотношением мономеров 29:1 смешивают:

- 4 мл 30% полиакриламида;
 - 1,5 мл 10× TBE,
 - 9,5 мл H₂O;
 - 100 мкл 10% персульфата аммония;
 - 14 мкл TEMED.
3. Раствор тщательно перемешать, быстро залить между стеклами и вставить гребенку, стараясь не занести пузырьков воздуха. Оставить для полимеризации на 20–30 мин.
 4. После полимеризации акриламида удалить гребенку и промыть образовавшиеся лунки 1× TBE.
 5. Собрать камеру для электрофореза, заполнить резервуары 1×TBE.
 6. В пробирки, содержащие ПЦР продукт, добавить 1/6 объема погружающего буфера.
 7. В лунки геля микропипеткой внести образцы. В крайние левую и правую лунки внести маркер молекулярного веса.
 8. Камеру подключить к источнику тока. Электрофоретическое разделение проводить при 150 В.

Окрашивание геля бромистым этидием.

После окончания электрофореза гель отделить от стекол и поместить в кювету с раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Окрашивать в течение 10 мин. Провести анализ и фотографирование электрофореграммы в УФ-свете

Интерпретация полученных данных

Ген II фактора свертываемости крови (мутация G20210A)

В результате амплификации образуются фрагменты ДНК различной длины: а) фрагмент длиной 216 пар оснований — образуется всегда при прохождении амплификации, является продуктом внешних праймеров; б) фрагмент длиной 150 пар оснований образуется в случае наличия аллеля G, является продуктом праймеров РПЦ(G) и РПЦ(2); в) фрагмент длиной 115 пар оснований образуется в случае наличия аллеля А, является продуктом праймеров РПЦ(А) и РПЦ(1). Интерпретация результатов проводится в соответствии с рис. 1.

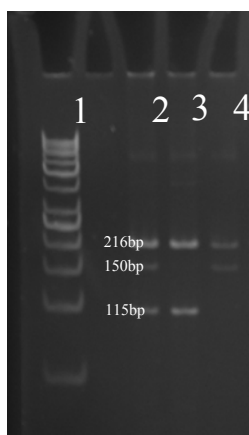


Рис. 1. Результат электрофореза при детекции мутации G20210A
 Лунка 1 – 50bp ladder, 2 – гетерозигота A/G, 3 – гомозигота A/A,
 4 – гомозигота G/G.

Ген V фактора свертываемости крови (мутация Лейден)

В результате амплификации образуются фрагменты ДНК различной длины: а) фрагмент длиной 299 пар оснований — образуется всегда при прохождении амплификации, является продуктом внешних праймеров; б) фрагмент длиной 208 пар оснований — образуется в случае наличия аллеля G, является продуктом праймеров FVL(G) и FVL(2); в) фрагмент длиной 142 пары оснований образуется в случае наличия аллеля A, является продуктом праймеров FVL(A) и FVL(1). Интерпретация результатов проводится в соответствии с рис. 2.

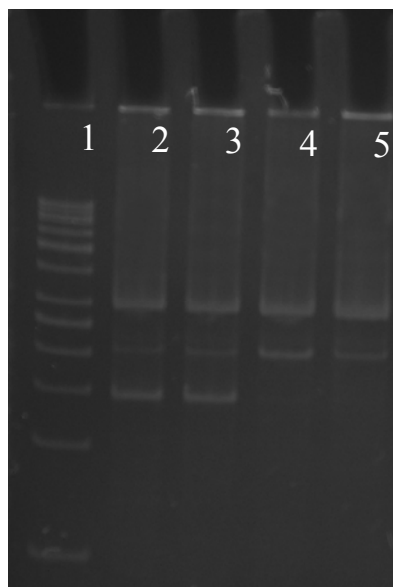


Рис. 2. Результат ПЦР для двух образцов
 Лунка 1 – Fermentas 50bp ladder, 2,3 – гетерозигота A/G, 4, 5 – гомозигота G/G

Ген XIII фактора свертывания крови (полиморфизм Val34Leu)

В результате амплификации образуются фрагменты ДНК различной длины: а) фрагмент длиной 170 пар оснований — образуется всегда при прохождении амплификации, является продуктом внешних праймеров; б) фрагмент длиной 130 пар оснований — образуется в случае наличия аллеля

Val34, является продуктом праймеров V34L-RI и Val34Leu-FO; в) фрагмент длиной 92 пары оснований образуется в случае наличия аллеля 34Leu, является продуктом праймеров V4L-FI и V34L-RO. Интерпретация результатов проводится в соответствии с рис. 3:

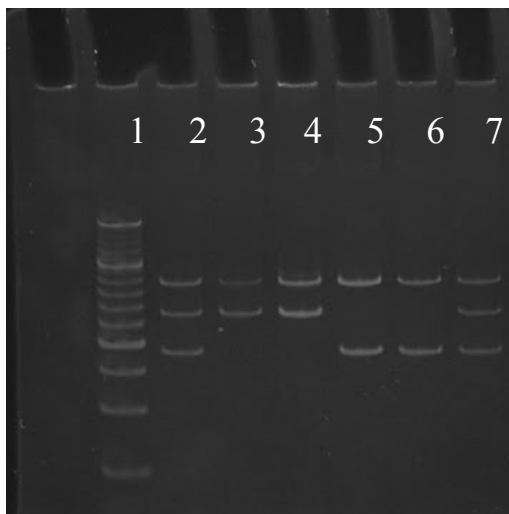


Рис. 3. Результат электрофореза при детекции мутации Val34Leu.
Лунка 1 – 20bp ladder, образцы 3,4 – гомозиготы по аллелю Val34, образцы 2,7 – гетерозиготы, образцы 5,6 – гомозиготы по аллелю 34Leu

Методика определения полиморфизма Thr312Ala гена α -цепи фибриногена

Для определения данного полиморфизма после окончания ПЦР необходимо провести этап рестрикции.

Проведение рестрикции

1. В пробирки для ПЦР внести по 10 мкл амплификата, затем 2 мкл 10x буфера для полимеразы и 1 ЕД рестриктазы RSAI.
2. Довести бидистиллированной деионизированной водой объем смеси до 30 мкл.
3. Поставить пробирки в термостат для инкубации при 37 °С на 6–10 ч.
4. По окончании инкубации провести электрофоретическое разделение фрагментов.

Интерпретация полученных данных

Из-за наличия двух постоянных сайтов рестрикции в случае аллеля Ala312 выявляются три фрагмента ДНК с длиной 25, 48 и 117 пар оснований. В случае аллеля Thr312 формируется дополнительный сайт рестрикции, в результате чего вместо фрагмента в 117 пар оснований формируются фрагменты длиной 78 и 39 пар оснований.

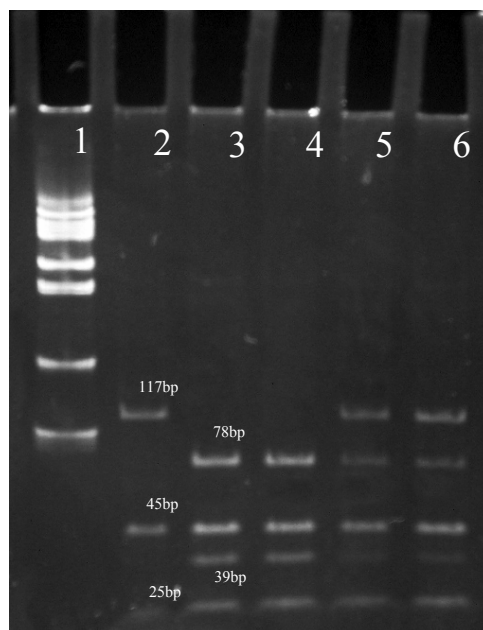


Рис. 4. Схема рестрикции 190 bp продукта амплификации рестриктазой Rsa I

Лунка 1 – 100bp ladder, образец 2 – гомозигота по аллелю 312Ala, образцы 3,4 – гомозиготы по аллелю Thr312, образцы 5,6 – гетерозиготы

Методика определения полиморфизма генов PAI-1 и LDLR с помощью автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием

Оборудование и материалы:

1. Генетический анализатор с программным обеспечением.
2. Программируемый термостат.
3. Миницентрифуга.
4. Автоматические пипетки переменного объема с одноразовыми сменными наконечниками.
5. Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл.
6. Пробирки объемом 1,5 мл.

Реактивы:

1. Маркер молекулярного веса.
2. Деионизированный формамид.
3. 4% раствор полимера для заполнения капилляра.
4. 10× ЭДТА буфер.
5. H₂O.

Подготовка прибора:

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

Анализ проводить при следующих параметрах:

- длина капилляра — 41 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура — 600° C;
- время инъекции образца в капилляр 7 с.;

- время разделения 24 мин.;
- напряжение 7,5 кВ.

Подготовка проб:

1. В пробирку добавить 1,5 мкл амплификата из каждой реакции, 0,5 мкл маркера молекулярного веса и 8,5 мкл деионизированного формамида.
2. Пробы денатурировать 4 мин при 95 °С.
3. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить на льду.
4. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.
5. Перенести весь объем пробы в микропробирки.

Анализ проб:

1. Установить штатив 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.
5. Проанализировать полученные данные.

Интерпретация полученных данных

Ген ингибитора активатора плазминогена (полиморфизмы 4G/5G)

Определение аллелей проводят по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа (Рис. 5). Продукт ПЦР размером 98 п.н. амплифицируется в том случае, если в анализируемом образце присутствует аллель с 4 гуаниновыми основаниями (4G). Аллель 5G имеет размер 99 п.н.

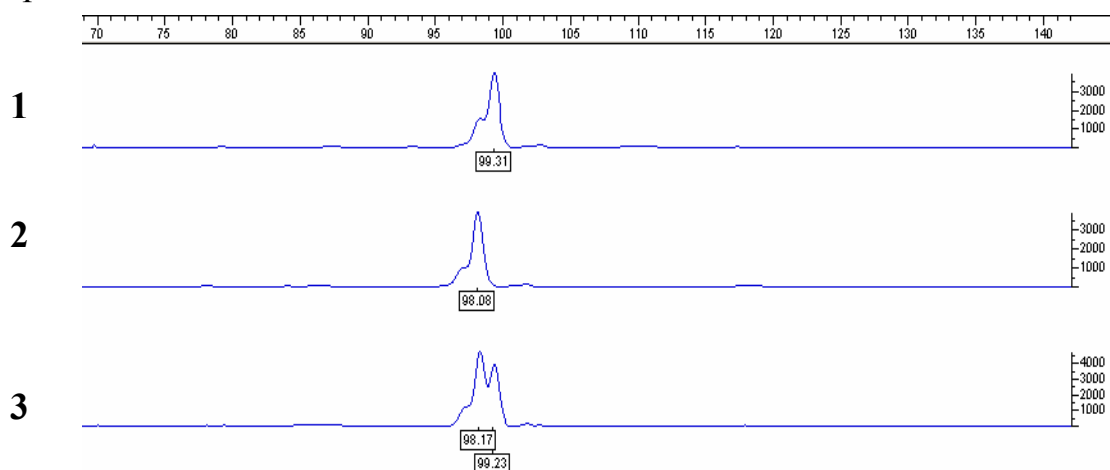


Рис. 5. Варианты генотипа по полиморфизму 4G/5G гена PAI-1.

Образец 1 – размер ДНК-фрагментов 98/98 (аллели 4/4); 2 – размер ДНК-фрагментов 99/99 (аллели 5/5); 3 – размер ДНК-фрагментов 98/99 (аллели 4/5)

Ген рецептора липопротеинов низкой плотности (18 ТА-повторы)

Определение аллелей проводят по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа (Рис. 6). Продукт ПЦР размером 103 п.н. амплифицируется в том случае, если в анализируемом образце присутствует аллель с 7 ТА повторами. Аллели 8, 10 и 11 имеют размер 105, 109 и 111 п.н. соответственно.

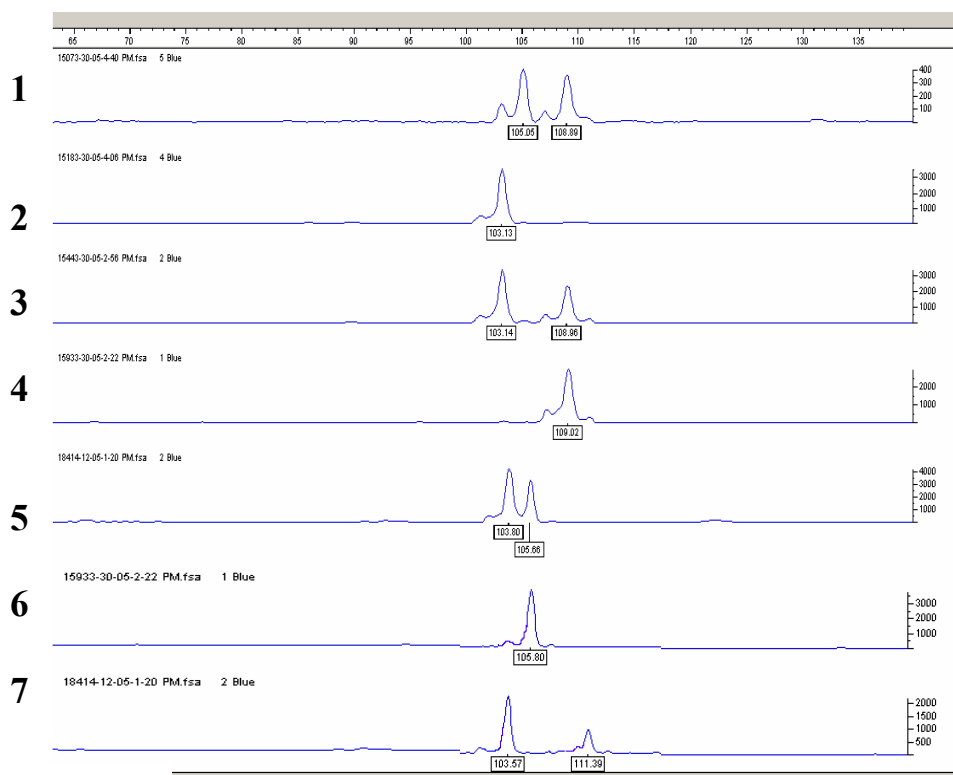


Рис. 6. Варианты генотипа по полиморфизму гена рецептора ЛПНП, идентифицированные в ходе проведения исследования
Образец 1 – аллели 8/10, 2 – 7/7, 3 – 7/10, 4 – 10/10, 5 – 7/8, 6 – 8/8, 7 – 7/11

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

В молекулярно-генетической лаборатории необходимо выделять несколько зон:

1. Зона экстрагирования ДНК — в ней осуществляют все этапы обработки биологического материала и выделения геномной ДНК.
2. Зона проведения ПЦР предназначена для внесения в пробирки компонентов амплификационной смеси и ДНК, а также для амплификации. В зонах экстрагирования ДНК и проведения ПЦР (первой и второй) не следует открывать пробирки с продуктами амплификации, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне.
3. Зона анализа продуктов ПЦР — в ней проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Для предотвращения возможных диагностических ошибок требуется соблюдение следующих правил:

- использовать только химически чистую и желательнo 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 осаждают 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 работника должно быть защищено экраном либо маской, работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют на новые.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИСКА ТРОМБОЗОВ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

Аллели и генотипы риска развития тромбозов, а также коэффициенты риска (OR) приведены в табл. 3.

Таблица 3

Аллели и генотипы риска тромбофилий

Ген	Полиморфизм/ мутация	Аллель риска	Генотип риска	OR
LDLR	ТА-повторы 18-го экзона	8ТА 11ТА	- -	2.4 высокий риск
PAI-1	4G/5G	-	4G/4G	1.4
FI	Thr/Ala	-	Thr/Ala	1.4
FII	A/G	A	-	2.2
FV	A/G	A	-	2.5
FXIII	Val/Leu	-	Leu /Leu	1.9

Если фактором риска является определенный аллель, то вероятность развития заболевания увеличивается, согласно приведенному в таблице OR для данного аллеля.

Если обнаруживается генотип, гомозиготный по данному аллелю, риск существенно возрастает.

Если фактором риска является определенный генотип, то наличие лишь одного аллеля, входящего в состав этого генотипа, фактором риска не является.

В случае наличия в генотипе двух или трех факторов риска, вероятность развития заболевания существенно возрастает.