

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

28.09.2012 г.

Регистрационный № 050-0412

**МЕТОД ДНК-ДИАГНОСТИКИ ЧИСЛОВЫХ АНОМАЛИЙ  
ХРОМОСОМ 13, 18, 21, X, Y НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ  
КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ:

Канд. биол. наук Т.В. Осадчук, канд. биол. наук К.А. Мосса

Минск 2012

В настоящей инструкции по применению представлен метод ДНК-диагностики числовых аномалий хромосом 13, 18, 21, X и Y (анеуплоидий), которые являются самой частой причиной врожденной патологии человека.

### **Показания к применению**

Молекулярно-генетический анализ может быть рекомендован для выявления трисомии хромосом 21 (синдром Дауна), 13 (синдром Патау), 18 (синдром Эдвардса), моносомии X (синдром Шерешевского-Тернера), полисомии X, дополнительной хромосомы X в мужском кариотипе (синдром Кляйнфельтера), триплоидии:

- при проведении пренатальной диагностики у плодов, имеющих высокий риск хромосомной патологии;
- новорожденным и пациентам с клиническими признаками хромосомной патологии;
- при установлении диагноза у плодов, удалённых по медико-генетическим показаниям.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, может применяться также для установления родительского происхождения дополнительной хромосомы при анеуплоидии или хромосомного набора при триплоидии.

**Противопоказания к применению** методов отсутствуют.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ**

### **Биологический материал**

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, клеток амниотической жидкости, тканей, ворсин хориона, а также небольшие фрагменты пятен крови, высушенные на специальных бланках.

### **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 MgCl<sub>2</sub>, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), праймеры, фланкирующие участок ДНК, содержащий анализируемый полиморфизм (табл. 1), бидистиллированная деионизированная вода (H<sub>2</sub>O).

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

### **Автоматический капиллярный электрофорез 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, 4% раствор полимера, 10X ЭДТА буфер, H<sub>2</sub>O.

Таблица 1

Основные параметры микросателлитных маркеров хромосом 21, 13, 18, X и Y, отобранных для диагностики анеуплоидии

Хромосома	Маркер	Область локализации	Размер	Концентрация	Последовательность праймеров	Метка
21	D21S11	q22.1	225-280	6 pM	TTT CTC AGT CTC CAT AAA TAT GTG	FAM
				6 pM	GAT GTT GTA TTA GTC AAT GTT CTC	
	D21S1411	q22.3	256-340	6 pM	ATA GGT AGA TAC ATA AAT ATG ATG A	NED
				6 pM	TAT TAA TGT GTG TCC TTC CAG GC	
	D21S1435	q21.3	160-200	3 pM	CCC TCT CAA TTG TTT GTC TAC C	FAM
				3 pM	ACA AAA GGA AAG CAA GAG ATT TCA	
13	D13S634	q21.33	385-440	2 pM	GGC AGA TTC AAT AGG ATA AAT AGA	FAM
				2 pM	GTA ACC CCT CAG GTT CTC AAG TCT	
	D13S252	q12.2	260-330	10 pM	GCA GAT GTA CTG TTT TCC TAC CAA	PET
				10 pM	AGA TGG TAT ATT GTG GGA CCT TGT	
	D13S305	q13.3	430-465	7 pM	GCC TGT TTG AGG ACC TGT CGT TA	VIC
				7 pM	TGG TTA TAG AGC AGT TAA GGC AC	
	D13S325	q14.11	235-320	5 pM	TCC TTT AAG TGT CTA GAG AGG AGG	VIC
				5 pM	TCT CTC TCA GAA GTT TGG AAG C	
18	D18S535	q12.3	455-500	5 pM	CAG CAA ACT TCA TGT GAC AAA AGC	FAM
				5 pM	CAA TGG TAA CCT ACT ATT TAC GTC	
	D18S386	q22.1	330-400	10 pM	TGA GTC AGG AGA ATC ACT TGG AAC	VIC
				10 pM	CTC TTC CAT GAA GTA GCT AAG CAG	
	D18S390	q22.3	272-300	5 pM	TAA CCA AAG CAA ATC CCT GG	NED
				5 pM	CAC TTA CAC TGT TAT CCT GG	
	D18S391	p11.31	140-180	1,5 pM	GGA CTT ACC ACA GGC AAT GTG ACT	VIC
				1,5 pM	TAG ACT TCA CTA TTC CCA TCT GAG	
X	DXS981	q13.1	225-260	3 pM	CTC CTT GTG GCC TTC CTT AAA TG	NED
				3 pM	TTC TCT CCA CTT TTC AGA GTC A	
	DXS1187	q26.2	122-170	1,5 pM	CAG CTA CTC AAT GAA AAG CC	NED
				1,5 pM	TGA TGG AGA AAG TCA CTG AAC	
Y	AMEL	Xp22.22/	104/110	1,5 pM	CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG	FAM

		Yp11.2		1,5 pM	ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG	
	DYS448	q11.22	323-381	2 pM	TGTCAAAGAGCTTCAATGGAGA	FAM
				2 pM	TCTTCCTTAACGTGAATTTCTC	

## **МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ХРОМОСОМ 13, 18, 21, X, Y**

### **Проведение ПЦР**

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 25 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 25 мкл содержит 1xПЦР буфер, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкM dATP/dCTP/dTTP/dGTP, от 1,5 до 10 пM 15 пар праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.
2. В пробирки для ПЦР внести по 24,5 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.
3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 10 мин при 94 °C, в течение 3 мин при 58 °C. Затем выполняется 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 94 °C, 1 мин отжига при 57 °C и 2 мин синтеза при 72 °C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 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 выполняют в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ производят при следующих параметрах:

- длина капилляра – 47 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура – 60 °С;
- время инъекции образца в капилляр 5 с;
- время разделения 28 мин;
- напряжение 7,5 кВ.

*Подготовка проб:*

1. В пробирку добавить 0,7 мкл амплификата из каждой реакции, 0,7 мкл маркера молекулярного веса и 8 мкл деионизированного формамида.
2. Пробы денатурировать 4 мин при 95 °С.
3. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить во льду.
4. Установить микропробирки в штатив анализатора.

*Анализ проб:*


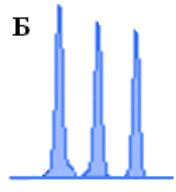

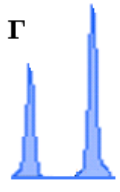

1. Установить штатив с микропробирками в анализатор.
2. Задать необходимые параметры анализа в программе сбора данных.
3. Запустить программу сбора данных.
4. После окончания разделения образцов и сбора данных перенести результаты в программу анализа данных.
5. Проанализировать полученные данные.

### **Интерпретация полученных данных**

Полученные данные анализируют, определяя количество аллелей микросателлитных маркеров соответствующих хромосом на электрофореграмме. Принцип метода заключается в том, что при анализе маркера, имеющего высокую степень полиморфизма, его аллели с большой вероятностью будут различаться в каждом из исследуемых локусов генома пациента. Такой анализ позволяет увидеть

столько аллелей маркера, сколько локусов или сцепленных с ним генов присутствует в геноме.

В норме это число составляет два для локусов аутосомных хромосом и хромосомы X у женщин и один для половых хромосом у мужчин. У пациентов с трисомиями аутосом маркеры будут иметь три аллеля за счет дополнительной хромосомы. У пациентов с моносомиями маркеры будут иметь один аллель за счет отсутствия одной из хромосом. Вероятность того, что все три аллеля маркера будут различаться по размеру, зависит от типа маркера и степени его полиморфизма, который определяется уровнем гетерозиготности в популяции. Интерпретация результатов проводится с учетом количества пиков и их относительной высоты на электрофореграмме. Различные варианты электрофореграмм, которые могут быть получены при анализе микросателлитных маркеров, представлены на рис. 1.

	Норма	Три аллеля			Неинформативно
	Отношение высот пиков между 0,8 и 1,4	Присутствие трех пиков почти равной высоты	Соотношение высот пиков более 1,8	Соотношение высот пиков менее 0,65	Единичный пик
<b>Примеры</b>					
	генотипы				
аутосома 18 (D18S390)	276/280	276/280/284	276/276/280	276/284/284	276? *
половые хромосомы X и Y (AMEL)	104/109 X Y	—	104/104/109 X X Y	104/109/109 X Y Y	104? * X

Примечание: \* количество аллелей определить невозможно.

Рис. 1. Различные варианты сочетания аллелей микросателлитных маркеров

В норме при использовании одного микросателлитного маркера на электрофореграмме можно увидеть два различных варианта: два пика с отношением высот между 0,8 и 1,4 (гетерозигота – рис. 1А) или один пик (гомозигота – рис. 1Д). Обнаружение одного пика не позволяет точно определить, сколько аллелей, а соответственно и генов, имеет данный человек.

При обнаружении трисомии с использованием одного маркера на электрофореграмме могут быть следующие варианты:

1. Присутствие трех пиков почти равной высоты (рис. 1Б) – наличие в геноме трех различных аллелей анализируемого маркера.

2. Присутствие двух пиков с соотношением между ними более 1,8 (рисунок 1В) – наличие в геноме трех аллелей: больший по высоте пик представлен двумя аллелями одной длины (меньшей), а меньший по высоте пик представлен третьим аллелем (большей длины) – дозовый эффект.

3. Присутствие двух пиков с соотношением между ними 0,65 (рисунок 1Г) – наличие в геноме трех аллелей: меньший по высоте пик представлен одним аллелем (меньшей длины), больший по высоте пик представлен двумя аллелями одной длины (большей) – дозовый эффект.

4. Присутствие одного пика (такой маркер является неинформативным) – рис. 1Д. В отношении хромосомы X возможно предполагать как моносомию, так и нормальный женский кариотип (гомозиготу).

Эффективности исследования, а также сокращения времени и затрат на молекулярно-генетический анализ можно добиться путем одновременного определения нескольких маркеров на одну хромосому, поскольку как минимум один из них будет информативным.



Разработанный протокол позволяет одновременно анализировать 15 микросателлитных маркеров на 5 хромосом (13, 18, 21, X и Y). Пример данной диагностики представлен на рис. 2 (патология отсутствует).

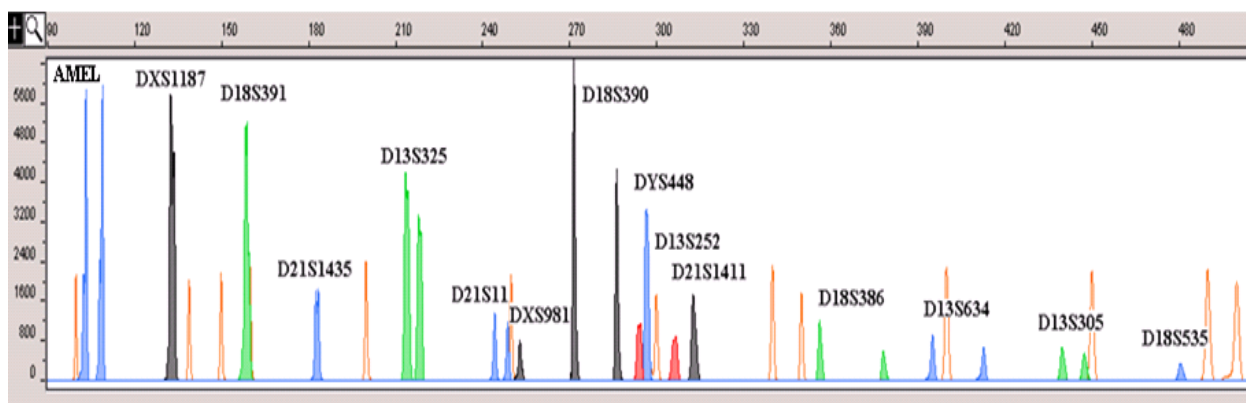


Рис. 2. Результаты ДНК-анализа 15 микросателлитных маркеров хромосом 21, 13, 18, X, Y – патология не выявлена

На рис. 3 приведены электрофореграммы с различными анеуплоидиями (трисомии хромосом 21, 13, 18, моносомия хромосомы X, дополнительная хромосома X в мужском кариотипе), информативные по нескольким микросателлитным маркерам.

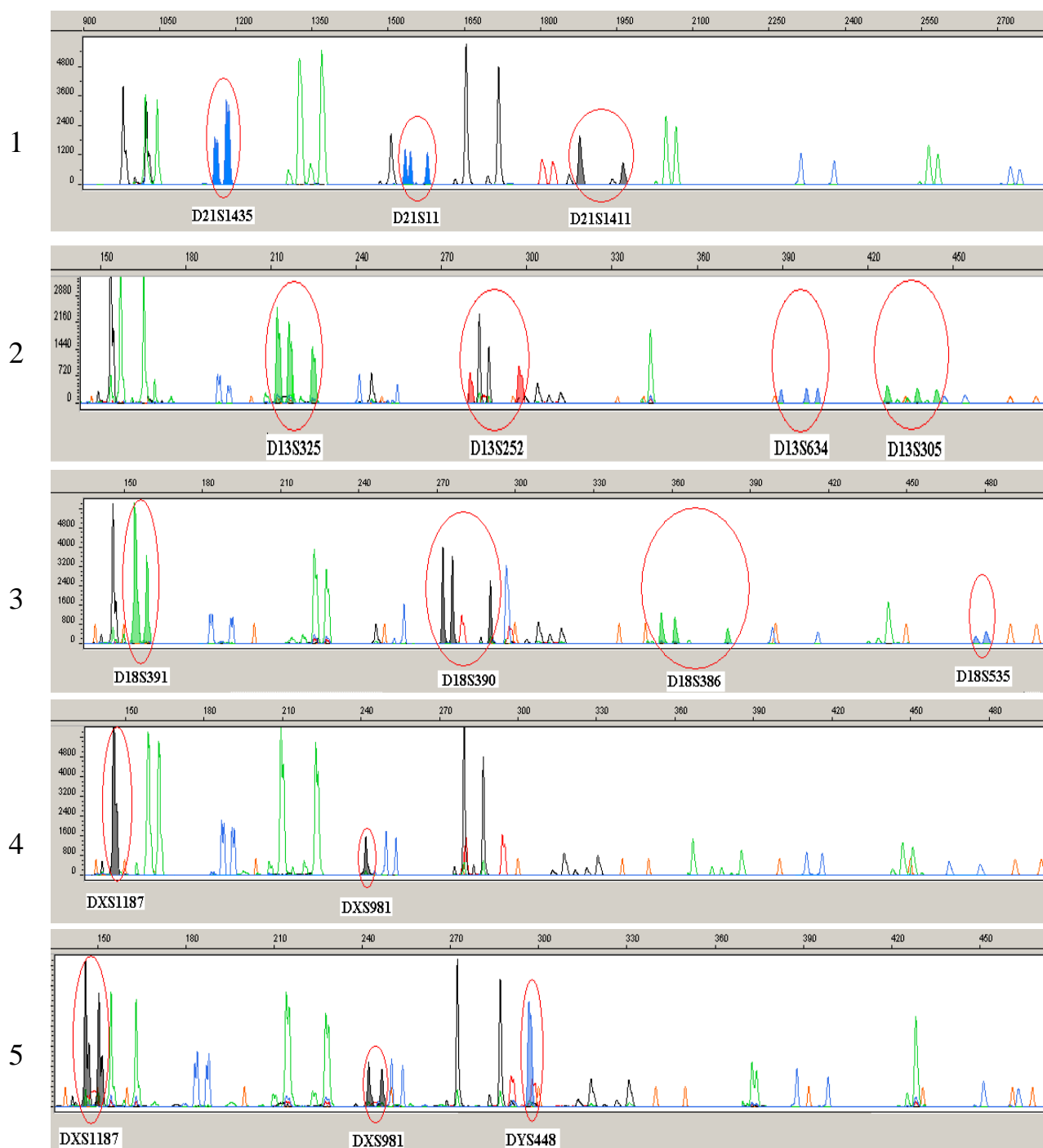


Рис. 3. Варианты электрофореграмм с различными анеуплоидиями:

1 – трисомия хромосомы 21 (синдром Дауна): три аллеля по маркеру D21S11, дозовый эффект по маркерам D21S1435 и D21S1411;

2 – трисомия хромосомы 13 (синдром Патау): три аллеля по маркерам D13S325, D13S634 и D13S305, дозовый эффект по маркеру D13S252;

3 – трисомия хромосомы 18 (синдром Эдвардса): три аллеля по маркерам D18S390, D18S386, дозовый эффект по маркерам D18S391 и D18S535;

4 – моносомия хромосомы X (синдром Шерешевского-Тернера): один аллель по маркерам DXS1187 и DXS981;

5 – дополнительная хромосома X в мужском кариотипе (синдром Кляйнфельтера): два аллеля по маркерам хромосомы X (DXS1187 и DXS981) и один аллель по маркеру хромосомы Y (DYS448).

### **Перечень возможных осложнений или ошибок при определении анеуплоидии 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 молекулярно-генетической 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.

При интерпретации результатов следует учитывать, что:

- Генетический анализатор, используемый для анализа, должен иметь аллельное разрешение 2 п.н. и функции подсчета площади под пиком/высоты пиков.

- Метод флуоресцентной количественной ПЦР может использоваться в дополнение к другим методам пренатальной диагностики. Данный метод рекомендован для тестирования хромосом

13, 18 и 21, который также можно использовать для выявления анеуплоидий по половым хромосомам, но не во всех случаях.

- Результаты анализа дают информацию о состоянии только определенного локуса, и этот метод не может заменить полный хромосомный анализ.

- Результаты, соответствующие моносомии X, когда все полиморфные маркеры содержат только один аллельный пик, и при этом отсутствуют последовательности Y-хромосомы, могут представлять случаи нормального женского генотипа, гомозиготного по всем использованным маркерам. Поэтому такие результаты должны быть подтверждены другой методикой либо интерпретированы как соответствующие моносомии X, но с вероятностью наличия у пациента нормального женского генотипа.

- Используемый метод позволяет идентифицировать увеличение или уменьшение количества хромосомного материала, но не объясняет тип перестройки хромосом.

- В случае наличия в кариотипе частичных трисомий или моносомий, возникающих в результате различных структурных перестроек, данная патология может быть не идентифицирована, если используемые маркеры не попадают в вовлеченный в перестройку локус.

- В случае наличия в кариотипе мозаицизма (двух и более клеточных клонов) регистрируемая электрофореграмма может иметь нестандартный вид и в некоторых ситуациях не получит интерпретации. Для выявления такой патологии будут требоваться другие методы исследования.