

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

  
Ю.Л.Горбич

2024 г.

Регистрационный № 085-1024

АЛГОРИТМЫ ДИАГНОСТИКИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ,  
МИОТОНИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, БОЛЕЗНИ ДВИГАТЕЛЬНОГО  
НЕВРОНА, ДРУГИХ СПИНАЛЬНЫХ МЫШЕЧНЫХ АТРОФИЙ И  
РОДСТВЕННЫХ СИНДРОМОВ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ  
ДИНАМИЧЕСКИМИ МУТАЦИЯМИ

инструкция по применению

Организации-разработчики: государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр неврологии и  
нейрохирургии», государственное учреждение «Республиканский научно-  
практический центр «Мать и дитя»

Авторы: д.м.н., доцент Рушкевич Ю.Н., к.м.н. Гусина А.А.,  
Мальгина Е.В., Пашук С.Н., Сталыбко А.С., Галиевская О.В.

Минск, 2024

## СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

БАС	–	Боковой амиотрофический синдром.
ДНК	–	Дезоксирибонуклеиновая кислота.
МД	–	Миотоническая дистрофия.
КФК	–	Креатинфосфокиназа.
МКБ	–	Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем.
ПЦР	–	Полимеразная цепная реакция.
ОФМД	–	Окулофарингеальная мышечная дистрофия
ЭДТА	–	Этилендиаминтетрауксусная кислота.
п.о.	–	Пары оснований.



В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) представлены алгоритмы диагностики первичных поражений мышц и болезни двигательного нейрона, обусловленных динамическими мутациями, которые могут быть использованы в комплексе мероприятий направленных на диагностику наследственных нервно-мышечных заболеваний, обусловленных динамическими мутациями.

Алгоритмы, изложенные в настоящей инструкции, предназначены для врачей-неврологов, врачей-генетиков, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с наследственными нервно-мышечными заболеваниями, в амбулаторных условиях и/или в стационарных условиях и/или в условиях отделения дневного пребывания.

### ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

G 71 – Первичные поражения мышц.

G 71.0 – Мышечная дистрофия. Наличие птоза, бульбарного синдром, гипотрофия, снижение подвижности языка, слабость мимических мышцах.

G 71.1 – Миотонические расстройства. Наличие вялого дистального пареза конечностей в сочетании с миотоническими феноменами, миалгий, респираторных расстройств, нарушения проводимости сердечного ритма, эндокринной патологии, катаракты.

G 12.2 – Болезнь двигательного нейрона.

G 12.8 – Другие спинальные мышечные атрофии и родственные синдромы. Наличие бульбарного синдрома, гипотрофий, снижения подвижности языка, слабости мимических мышц, фасцикуляций, сопутствующей патологии (гинекомастия, тестикулярная атрофия, бесплодие, частичная нечувствительность к андрогенам, сахарный диабет).

### ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказания, соответствующие таковым для медицинского применения медицинских изделий, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.



ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ,  
РЕАГЕНТОВ, АППАРАТНОГО И ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ  
ДЛЯ АНАЛИЗА И ДОКУМЕНТИРОВАНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ  
РЕЗУЛЬТАТОВ И Т.Д.

- 1 Неврологический молоток.
- 2 Электронеуромиограф.
- 3 Диагностический тест-системы для определения уровня креатинфосфокиназы (КФК) в сыворотке крови.
- 4 Медицинские изделия и реагенты для выделения ДНК.
  - 4.1 Медицинские изделия:
    - 4.1.1 воздушный термостат, позволяющий поддерживать температуру 56 °С;
    - 4.1.2 центрифуга, позволяющая проводить центрифугирование с центробежным ускорением 12000 g.
  - 4.2 Реагенты для выделения ДНК, предназначенные для молекулярно-биологических исследований:
    - 4.2.1 протеиназа К;
    - 4.2.2 лаурилсульфат натрия;
    - 4.2.3 натрия хлорид;
    - 4.2.4 натрия ацетат;
    - 4.2.5 этанол;
    - 4.2.6 трис;
    - 4.2.7 этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).
- 5 Медицинские изделия и реагенты для выполнения полимеразной цепной реакции.
  - 5.1 Медицинские изделия:
    - 5.1.1 амплификатор.
  - 5.2 Реагенты для выполнения полимеразной цепной реакции, предназначенные для молекулярно-биологических исследований:
    - 5.2.1 праймеры;
    - 5.2.2 буферный раствор для ПЦР;
    - 5.2.3 магния хлорид;
    - 5.2.4 комплект дезоксирибонуклеотидов;
    - 5.2.5 Таq-полимеразы, предназначенные производителем для амплификации фрагментов до 5000 пар оснований (п.о.), для амплификации GC-богатых последовательностей, для амплификации фрагментов до 20000 п.о. (или аналоги).
- 6 Медицинские изделия и реагенты, предназначенные для фрагментного анализа.
  - 6.1 Медицинские изделия:



- 6.1.1 амплификатор;
- 6.1.2 генетический анализатор.
- 6.2 Реагенты для фрагментного анализа, предназначенные для молекулярно-биологических исследований:
  - 6.2.1 деионизированный формамид;
  - 6.2.2 маркер молекулярного веса;
  - 6.2.3 полимер для генетического анализатора POP-7 или аналог.
- 7 Аппаратное и программное обеспечение, предназначенное для анализа и документации полученных результатов:
  - 7.1 персональный компьютер;
  - 7.2 программное обеспечение: Data Collection, предназначенное для управления и сбора данных с генетического анализатора; GeneMapper™ Software, предназначенное для оценки качества и анализа данных, полученных в результате работы генетического анализатора, для определения длин фрагментов ДНК, или аналогичное.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛГОРИТМОВ

1 Алгоритм диагностики мышечной дистрофии, обусловленной динамическими мутациями (окулофарингеальная мышечная дистрофия) (приложение А)

Диагноз мышечной дистрофии (G 71.0), обусловленной динамическими мутациями (окулофарингеальная мышечная дистрофия – ОФМД) устанавливают:

- 1.1 по клиническим признакам: наличие птоза, бульбарного синдрома, мышечной слабости в мимических мышцах, мышцах конечностей и/или туловища;
- 1.2 по биохимическим показателям: содержание КФК в сыворотке выше нормы (более 170 Ед/л у женщин и 195 Ед/л у мужчин);
- 1.3 по электрофизиологическим признакам: по данным электромиографии – первично-мышечный уровень поражения;
- 1.4 по результатам молекулярно-генетического исследования ДНК пациентов – мутация в гене PABPN1:
  - 1.4.1 получают биологический материал для выполнения молекулярно-генетического исследования – ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови;
  - 1.4.2 выполняют молекулярно-генетическое исследование ДНК пациентов;



1.4.2.1 выполняют амплификацию участка гена RABPN1, содержащего повторы:

1.4.2.1.1 для амплификации используют 50-100 нг ДНК;

1.4.2.1.2 для амплификации используют праймеры, указанные в таблице 1 приложения Б, составляют общую реакционную смесь в соответствии с таблицей 2 приложения Б;

1.4.2.1.3 программа амплификации: начальная денатурация 95 °С в течение 5 мин, 35 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 95 °С в течение 30 с, отжиг праймеров при температуре, 70 °С в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 30 с, конечная элонгация при 72 °С в течение 20 мин;

1.4.2.2 выполняют детекцию продуктов амплификации участка гена RABPN1 (Приложение В);

1.4.2.3 выполняют интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации участка гена RABPN1 (пункт 1 Приложения Г);

1.4.2.4 на основании рассчитанного числа GCN повторов в гене RABPN1 устанавливают окончательный диагноз:

1.4.2.4.1 обнаружены два аллеля с числом повторов 10 и менее – диагноз ОФМД исключен;

1.4.2.4.2 обнаружен один или два аллеля с числом повторов 11 и более – диагноз ОФМД (G71.0).

2 Алгоритм диагностики миотонических расстройств, обусловленных динамическими мутациями (миотоническая дистрофия) (приложение Д)

Диагноз миотонических расстройств (G 71.1), обусловленных динамическими мутациями (миотоническая дистрофия – ДМ), устанавливают:

2.1 по клиническим признакам: характерен преимущественно дистальный парез конечностей в сочетании с миотоническими феноменами, миалгии, внесмышечная патология в виде респираторных расстройств, нарушения проводимости сердечного ритма, эндокринной патологии, катаракты;

2.2 по биохимическим показателям: КФК в сыворотке крови выше нормы (более 170 Ед/л у женщин и 195 Ед/л у мужчин);

2.3 по электрофизиологическим признакам: по данным электромиографии первично-мышечный уровень поражения со спонтанной активностью в виде миотонических разрядов;

2.4 по результатам молекулярно-генетического исследования выделяют миотоническую дистрофию 1 типа (МД1), обусловленную



экспансией CTG-повтора в гене DMPK и миотоническую дистрофию 2 типа (МД2), обусловленную экспансией CCTG-повтора в гене CNBP:

2.4.1 получают биологический материал для выполнения молекулярно-генетического исследования – ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови;

2.4.2 выполняют молекулярно-генетическое исследование ДНК пациентов на МД1:

2.4.2.1 выполняют определение числа повторов CTG в гене DMPK и при необходимости детекцию аллелей с числом повторов 36 и более:

2.4.2.1.1 выполняют амплификацию участка гена DMPK для определения числа повторов:

2.4.2.1.1.1 для амплификации используют 50-100 нг ДНК;

2.4.2.1.1.2 для амплификации используют праймеры, указанные в таблице 3 приложения Б, составляют общую реакционную смесь в соответствии с таблицей 3 приложения Б;

2.4.2.1.1.3 программа амплификации: начальная денатурация 95 °С в течение 10 мин, 35 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 95 °С в течение 45 с, отжиг праймеров при температуре, 68 °С в течение 8 с, элонгация при 72 °С в течение 3 мин.; конечная элонгация при 72 °С в течение 30 мин;

2.4.2.1.2 выполняют при необходимости амплификацию участка гена DMPK для детекции аллелей с числом повторов 36 и более:

2.4.2.1.2.1 для амплификации используют 50-100 нг ДНК;

2.4.2.1.2.2 для амплификации используют праймеры, указанные в таблице 5 приложения Б, составляют общую реакционную смесь в соответствии с таблицей 6 приложения Б;

2.4.2.1.2.3 программа амплификации: начальная денатурация 95 °С в течение 5 мин, 55 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 95 °С в течение 45 с, отжиг праймеров при температуре 57 °С в течение 45 с, элонгация при 72 °С в течение 1 мин 30 с.; конечная элонгация при 72 °С в течение 10 мин;

2.4.2.2 выполняют детекцию продуктов амплификации участков гена DMPK (Приложение В);

2.4.2.3 выполняют интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации участков гена DMPK (пункт 2 Приложения Г);

2.4.2.4 на основании рассчитанного числа повторов CTG в 3'-нетранслируемой области гена DMPK устанавливают окончательный диагноз:

2.4.2.4.1 обнаружены два аллеля с числом повторов менее 35 и менее – диагноз МД1 исключен;



2.4.2.4.2 обнаружен один аллель с числом повторов 35 и менее – перейти к детекции аллелей с числом повторов 36 и более;

2.4.2.4.3 выявлен аллель с числом повторов 36 и более – диагноз МД1 установлен;

2.4.2.4.4 аллель с числом повторов 36 и более не выявлен – диагноз МД1 исключен.

2.4.3 выполняют молекулярно-генетическое исследование ДНК пациентов на МД2:

2.4.3.1 выполняют определение числа повторов ССТG в гене CNBP и при необходимости детекцию аллелей с числом повторов 27 и более:

2.4.3.1.1 выполняют амплификацию участка гена CNBP для определения числа повторов:

2.4.3.1.1.1 для амплификации используют 50-100 нг ДНК;

2.4.3.1.1.2 для амплификации используют праймеры, указанные в таблице 7 приложения Б, составляют общую реакционную смесь в соответствии с таблицей 8 приложения Б;

2.4.3.1.1.3 программа амплификации: начальная денатурация 94 °С в течение 5 мин, 45 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 94 °С в течение 30 с, отжиг праймеров при температуре, 60 °С в течение 15 с, элонгация при 72 °С в течение 30 с.; конечная элонгация при 72 °С в течение 10 мин;

2.4.3.1.2 выполняют при необходимости амплификацию участка гена CNBP для детекции аллелей с числом повторов 27 и более:

2.4.3.1.2.1 для амплификации используют 50-100 нг ДНК;

2.4.3.1.2.2 для амплификации используют праймеры, указанные в таблице 9 приложения Б, составляют общую реакционную смесь в соответствии с таблицей 10 приложения Б;

2.4.3.1.2.3 программа амплификации: начальная денатурация 95 °С в течение 5 мин, 55 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 95 °С в течение 45 с, отжиг праймеров при температуре 55 °С в течение 45 с, элонгация при 72 °С в течение 1 мин 30 с.; конечная элонгация при 72 °С в течение 10 мин;

2.4.3.2 выполняют детекцию продуктов амплификации участков гена CNBP (Приложение В);

2.4.3.3 выполняют интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации участков гена CNBP (пункт 3 Приложения Г);

2.4.3.4 на основании рассчитанного числа повторов ССТG в интроне 1 гена CNBP устанавливают окончательный диагноз:

2.4.3.4.1 обнаружены два аллеля с числом повторов 26 и менее – диагноз МД2 исключен;



2.4.3.4.2 обнаружен один аллель с числом повторов 26 и менее – перейти к детекции аллелей с числом повторов 27 и более;

2.4.3.4.3 выявлен аллель с числом повторов 27 и более – диагноз МД2 установлен;

2.4.3.4.4 аллель с числом повторов 27 и более не выявлен – диагноз МД2 исключен.

3 Алгоритм диагностики болезни двигательного нейрона, обусловленной динамическими мутациями (боковой амиотрофический склероз, обусловленный мутацией в гене *C9orf72*) (приложение Е)

Диагноз болезни двигательного нейрона (G12.2), обусловленной динамическими мутациями (боковой амиотрофический склероз, обусловленный мутацией в гене *C9orf72*) устанавливается:

3.1 по клиническим признакам: характерны смешанные парезы в конечностях, бульбарные и псевдобульбарные нарушения, когнитивные нарушения (деменция, параноидальное, бредовое или иррациональное мышление);

3.2 по биохимическим показателям: содержание КФК в сыворотке крови выше нормы (более 170 Ед/л у женщин и 195 Ед/л у мужчин);

3.3 по электрофизиологическим признакам: по данным электромиографии признаки переднерогового поражения;

3.4 по результатами молекулярно-генетического исследования – мутация в гене *C9orf72*:

3.4.1 получают биологический материал для выполнения молекулярно-генетического исследования – ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови;

3.4.2 выполняют молекулярно-генетическое исследование БАС, обусловленного мутацией в гене *C9orf72*:

3.4.2.1 выполняют определение числа повторов GGGGCC в гене *C9orf72* и при необходимости детекцию аллелей с числом повторов 25 и более:

3.1.2.1.1 выполняют амплификацию участка гена *C9orf72* для определения числа повторов:

3.1.2.1.1.1 для амплификации используют 50-100 нг ДНК;

3.1.2.1.1.2 для амплификации используют праймеры, указанные в таблице 11 приложения Б, составляют общую реакционную смесь в соответствии с таблицей 12 приложения Б, смесь разливают по 18 мкл в чистые промаркированные ПЦР-пробирки, готовят смесь праймеров в соответствии с таблицей 13 приложения Б, добавляют в ПЦР-пробирки с реакционной смесью по 1 мкл смеси праймеров и 1 мкл образца ДНК;



3.1.2.1.1.3 программа амплификации: начальная денатурация 94 °С в течение 7 мин, 35 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 95 °С в течение 45 с, денатурация при температуре 98 °С в течение 10 с, отжиг праймеров при температуре 58 °С в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 6 мин со снижением температуры на 0,6 °С/с; конечная элонгация при 78 °С в течение 10 мин;

3.1.2.1.2 выполняют при необходимости амплификацию участка гена *C9orf72* для детекции аллелей с числом повторов 25 и более:

3.1.2.1.2.1 для амплификации используют 50-100 нг ДНК;

3.1.2.1.2.2 для амплификации используют праймеры, указанные в таблице 14 приложения Б, составляют общую реакционную смесь в соответствии с таблицей 15 приложения Б, смесь разливают по 16 мкл в чистые промаркированные ПЦР-пробирки, готовят смесь праймеров в соответствии с таблицей 16 приложения Б, добавляют в ПЦР-пробирки с реакционной смесью по 3 мкл смеси праймеров и 1 мкл образца ДНК;

3.1.2.1.2.3 программа амплификации: начальная денатурация 94 °С в течение 7 мин, 35 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 95 °С в течение 45 с, денатурация при температуре 98 °С в течение 10 с, отжиг праймеров при температуре 62 °С в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 6 мин со снижением температуры на 0,6 °С/с; конечная элонгация при 78 °С в течение 10 мин;

3.1.2.2 выполняют детекцию продуктов амплификации участков гена *C9orf72* (Приложение В);

3.1.2.3 выполняют интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации участков гена *C9orf72* (пункт 4 Приложения Г);

3.1.2.4 на основании рассчитанного числа повторов GGGGCC в гене *C9orf72* устанавливают окончательный диагноз:

3.1.2.4.1 обнаружены два аллеля с числом повторов менее 24 и менее – диагноз БАС, обусловленный экспансией GGGGCC повторов в гене *C9orf72*, исключен;

3.1.2.4.2 обнаружен один аллель с числом повторов 24 и менее – перейти к детекции аллелей с увеличенным числом повторов;

3.1.2.4.3 выявлен аллель с числом повторов 25 и более – диагноз БАС, обусловленный экспансией GGGGCC повторов в гене *C9orf72*, установлен;

3.1.2.4.4 аллель с числом повторов 25 и более не выявлен – диагноз БАС, обусловленный экспансией GGGGCC повторов в гене *C9orf72*, исключен.



4 Метод диагностики других спинальных мышечных атрофий и родственных синдромов, обусловленных динамическими мутациями (бульбоспинальная мышечная атрофия Кеннеди) (приложение Ж)

Диагноз других спинальных мышечных атрофий и родственных синдромов (G 12.8), обусловленных динамическими мутациями (бульбоспинальная мышечная атрофия Кеннеди), устанавливается:

4.1 по клиническим признакам: характерно наличие бульбарного синдрома, слабости мимических мышц и в мышцах конечностей, фасцикуляций, немышечной патологии (гинекомастия, тестикулярная атрофия, бесплодие, частичная нечувствительность к андрогенам, сахарный диабет);

4.2 по биохимическим показателям: содержание КФК в сыворотке крови выше нормы (более 170 Ед/л у женщин и 195 Ед/л у мужчин);

4.3 по электрофизиологическим признакам: по данным электромиографии признаки переднерогового поражения;

4.4. по результатам молекулярно-генетического исследования: мутация в гене AR:

4.4.1 получают биологический материал для выполнения молекулярно-генетического исследования – ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови;

4.4.2 выполняют молекулярно-генетическое исследование бульбоспинальной мышечной атрофии Кеннеди;

4.4.2.1 выполняют амплификацию участка гена AR, содержащего повторы:

4.4.2.1.1 для амплификации используют 50-100 нг ДНК;

4.4.2.1.2 для амплификации используют праймеры, указанные в таблице 17 приложения Б, составляют общую реакционную смесь в соответствии с таблицей 18 приложения Б;

4.4.2.1.3 программа амплификации: начальная денатурация 95 °С в течение 5 мин, 35 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 95 °С в течение 1 мин, отжиг праймеров при температуре, 68 °С в течение 45 с, элонгация при 72 °С в течение 45 с; конечная элонгация при 72 °С в течение 7 мин;

4.4.2.2 выполняют детекцию продуктов амплификации участков гена AR (Приложение В);

4.4.2.3 выполняют интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации участков гена AR (пункт 5 Приложения Г);

4.4.2.4 на основании рассчитанного числа повторов CAG в экзоне 1 гена AR устанавливают окончательный диагноз;

4.4.2.4.1 обнаружен один аллель с числом повторов 34 и менее у лица мужского пола либо два аллеля с числом повторов 34 и менее у лица женского пола – диагноз спинальная мышечная атрофия, обусловленная динамическими мутациями (бульбоспинальная мышечная атрофия Кеннеди) исключен;

4.4.2.4.2 обнаружен один аллель с числом повторов 35 и более у лица мужского пола – диагноз спинальная мышечная атрофия, обусловленная динамическими мутациями (бульбоспинальная мышечная атрофия Кеннеди) установлен;

4.4.2.4.3 обнаружены два аллеля с числом повторов 35 и более у лица женского пола – диагноз спинальная мышечная атрофия, обусловленная динамическими мутациями (бульбоспинальная мышечная атрофия Кеннеди) установлен.



## ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1 Ошибки, связанные с нарушением правил получения, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований. Для предупреждения ошибок этой группы необходимо тщательно соблюдать правила работы с биологическим материалом и инструкции по проведению лабораторных исследований.

2 Ошибки при выполнении лабораторных исследований, связанные с несоблюдением методики исследований, использованием реагентов, утративших активность, загрязнением исследуемых образцов продуктами реакций и др. Для предупреждения таких ошибок необходимо соблюдать методики исследований, контролировать годность реагентов, использовать контрольные материалы и образцы.

Алгоритм диагностики мышечной дистрофии, обусловленной динамическими мутациями (окулофарингеальная мышечная дистрофия)

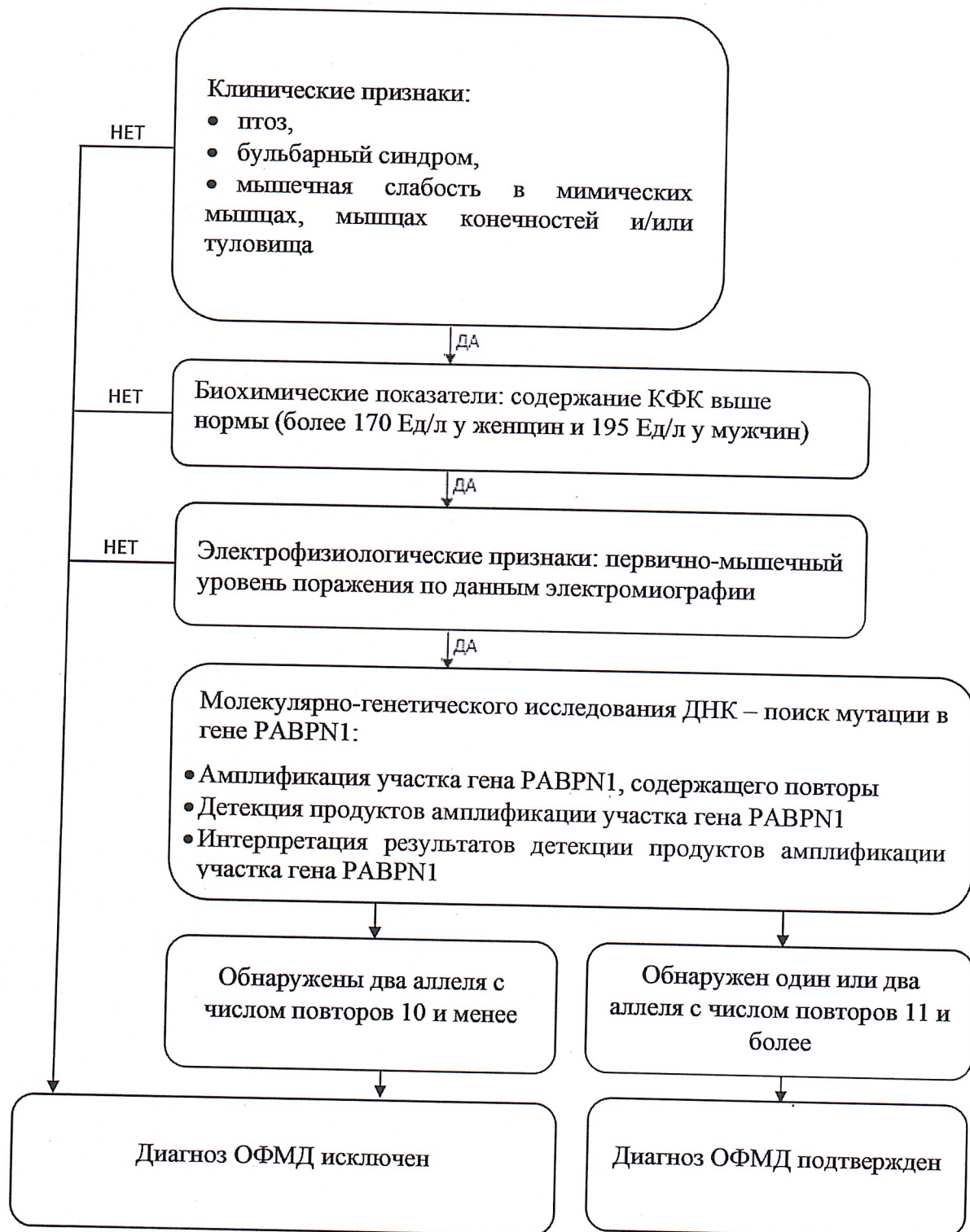




Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации участка гена RABPN1 для определения числа повторов

Название	Последовательность праймеров, 3'-5'	Метка 5'
RABPN1_F	CGCAGTGCCCCGCCTTAGA	FAM
RABPN1_R-	ACAAGATGGCGCCGCCCCGGC	

Таблица 2 – Состав реакционной смеси для амплификации участка гена RABPN1 для определения числа повторов

Реагент	Объем реагента на 1 реакцию (V=50 мкл)	Конечная концентрация
10x ПЦР буфер	5 мкл	1x
10mM DNTP	1 мкл	0,2 mM
25mM MgCl <sub>2</sub>	1 мкл	2 mM
Q-Solution	10 мкл	-
10 pmol primer F	1 мкл	10 pmol
10 pmol primer R	1 мкл	10 pmol
DNA	1 мкл	200 нг
Polymerasa Quien 5 ЕД/мкл	0,2 мкл	1 ЕД
H <sub>2</sub> O	29,8 мкл	-

Таблица 3 – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации участка гена DMPK для определения числа повторов

Последовательность праймеров, 3'-5'	Метка 5'
CTCCCCAGAGCAGGGCGTCATGCACAAG	
CGACTCCGGGGCCCCGTTGGAAGACT	FAM

Таблица 4 – Состав реакционной смеси для амплификации участка гена DMPK для определения числа повторов

Реагент	Объем стока на 1 реакцию	Финальная концентрация
10x ПЦР буфер	2,5 мкл	1x
10mM DNTP	0,5 мкл	0,2 mM
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,0 мкл	2,0 mM
10 pmol primer F	0,5 мкл	2 pmol
10 pmol primer R	0,5 мкл	2 pmol
DNA	1 мкл	200 нг
Polymerasa 5 ЕД/мкл	0,2 мкл	1 ЕД
H <sub>2</sub> O	18,8 мкл	-

Таблица 5 – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации участка гена DMPK для детекции аллелей с увеличенным числом повторов

Название	Последовательность праймеров, 3'-5'	Метка 5'
MD1_F	GCTCGAAGGGTCTTGTAGCC	
MD1,2_F-	GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC	FAM



MD1_RL	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGCAGCAGCAG CAGCAGCAGC	
--------	--	--

Таблица 6 – Состав реакционной смеси для амплификации участка гена DMPK для детекции аллелей с увеличенным числом повторов

Компонент	Объем реагента на 1 реакцию	Финальная концентрация
10x ПЦР буфер (магний 1,5 mM)	2,5 мкл	1x
10mM DNTP	0,5 мкл	0,2 mM
10 μM primer MD1_F	0,5 мкл	0,2 μM
10 μM primer MD1,2_F	0,5 мкл	0,2 μM
1 μM primer MD1_RL	1,0 мкл	0,04 μM
DNA	1 мкл	200 нг
Polymerasa 5 ЕД/мкл	0,5 мкл	1 ЕД
5xQsol	5 мкл	1x
H2O	13,5 мкл	-

Таблица 7 – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации участка гена CNBP для определения числа повторов

Название	Последовательность праймеров, 3'-5'	Метка 5'
DM2_F	TTGGACTTGGAATGAGTGAATG	FAM
DM2_R	AGCCGAGATCATACCACTGCAC	

Таблица 8 – Состав реакционной смеси для амплификации участка гена CNBP для определения числа повторов

Реагент	Объем стока на 1 реакцию	Финальная концентрация
10x ПЦР буфер	2,5 мкл	1x
10mM DNTP	0,5 мкл	0,2 mM
50mM MgCl2	1,0 мкл	2,0 mM
10 pmol primer F	0,5 мкл	2 pmol
10 pmol primer R	0,5 мкл	2 pmol
DNA	1 мкл	200 нг
Polymerasa 5 ЕД/мкл	0,2 мкл	1 ЕД
H2O	18,8 мкл	-

Таблица 9 – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации участка гена CNBP для детекции аллелей с увеличенным числом повторов

Название	Последовательность праймеров, 3'-5'	Метка 5'
MD2_F	GAATGAGTGAATGAGTATTACTGCCAG	
MD1,2_F-	GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC	FAM
MD2_RL	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGCAGGCAGGC AGGCAGGCAG	



Таблица 10 – Состав реакционной смеси для амплификации участка гена CNBP для детекции аллелей с увеличенным числом повторов

Компонент	Объем реагента на 1 реакцию	Финальная концентрация
10x ПЦР буфер (магний 1,5 mM)	2,5 мкл	1x
10mM DNTP	0,5 мкл	0,2 mM
10 μM primer MD2_F	0,5 мкл	0,2 μM
10 μM primer MD1,2_F	0,5 мкл	0,2 μM
1 μM primer MD2_RL	1,0 мкл	0,04 μM
DNA	1 мкл	200 нг
Polymerasa 5 ЕД/мкл	0,5 мкл	1 ЕД
5xQsol	5	1x
H <sub>2</sub> O	13,5 мкл	-

Таблица 11 – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации участка гена C9orf72 для определения числа повторов

Название	Последовательность праймеров, 3'-5'	Метка 5'
C9orf72_R6	CCTCACTCACCCACTCGCCAC	
C9orf72_F3	AGCAAGCTCTGGAACCTCAGGAGTCG	FAM

Таблица 12 – Состав реакционной смеси для амплификации участка гена C9orf72 для определения числа повторов

Реагент	Объем реагента на 1 реакцию (V=20 мкл)	Конечная концентрация
Буфер	2 мкл	0,5x
DMSO	0,4 мкл	-
Enhancer B	2 мкл	1 x
Полимераза SequalPrep Long, Invitrogen, 5 ЕД/мкл	0,36 мкл	1,8 ЕД
H <sub>2</sub> O	13,24 мкл	-

Таблица 13 – Состав смеси праймеров для амплификации участка гена C9orf72 для определения числа повторов

Праймер	Объем праймера на 1 реакцию (V=20 мкл)
C9orf72_R6	0,5 мкл
C9orf72_F3	0,5 мкл

Таблица 14 – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации участка гена C9orf72 для детекции аллелей с увеличенным числом повторов

Название	Последовательность праймеров, 3'-5'	Метка 5'
C9orf72_R8	CGGGCGCAGGCACCGCAACC	FAM
C9orf72_Tail R	TACGCATCCCAGTTTGAGACG	



C9orf72_RepF3	TACGCATCCCAGTTTGAGACGGGCCGGGGCCGGGGC CGG	
---------------	---	--

Таблица 15 – Состав реакционной смеси для амплификации участка гена C9orf72 для детекции аллелей с увеличенным числом повторов

Реагент	Объем реагента на 1 реакцию (V=20 мкл)	Конечная концентрация
Буфер	2 мкл	0,5x
DMSO	0,4 мкл	-
Enhancer A	2 мкл	1 x
Полимераза SequelPrep Long, Invitrogen, 5 ЕД/мкл	0,36 мкл	1,8 ЕД
H <sub>2</sub> O	11,24 мкл	-

Таблица 16 – Состав смеси праймеров для амплификации участка гена C9orf72, для детекции аллелей с увеличенным числом повторов.

Праймер	Объем праймера на 1 реакцию (V=20 мкл)
C9orf72 R8	1 мкл
C9orf72 Tail R	1,5 мкл
C9orf72_RepF3	0,5 мкл

Таблица 17 – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации участка гена AR для определения числа повторов

Название	Последовательность праймеров, 3'-5'	Метка 5'
SBMA2 F	AGGCACCCAGAGGCCGCGAG	FAM
SBMA2_R-	GTTTCTTTAGCCTGTGGGGCCTCTACGA	

Таблица 18 – Состав реакционной смеси для амплификации участка гена AR для определения числа повторов

Реагент	Объем стока на 1 реакцию	Финальная концентрация
10x ПЦР буфер	2,5 мкл	1x
10mM DNTP	0,5 мкл	0,2 mM
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,0 мкл	2,0 mM
10 pmol primer F	0,5 мкл	2 pmol
10 pmol primer R	0,5 мкл	2 pmol
DNA	1 мкл	200 нг
Polimerasa 5 ЕД/мкл	0,2 мкл	1 ЕД
H <sub>2</sub> O	18,8 мкл	-



ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ УЧАСТКОВ ГЕНОВ  
DMPK, CNBP, AR, C9ORF72, PABPN1

- 1 Детекцию продуктов амплификации осуществлять с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе.
- 2 Подготовить к работе генетический анализатор в соответствии с инструкцией производителя.
- 3 Анализ проводить при следующих параметрах: длина капилляра — 50 см, заполнение капилляра полимером POP7, температура — 60°C; время инъекции образца в капилляр 20 сек, время разделения 45 мин, напряжение 7,5 кВ.
- 4 Перед проведением электрофореза 1 мкл образца продукта амплификации из каждой реакции смешать с 1 мкл маркера молекулярного веса и 8 мкл деионизированного формамида.
- 5 Смесь поместить в 96-луночный планшет для генетического анализатора и денатурировать в амплификаторе. Программа денатурации: нагревание при температуре 95°C в течение 5 минут, охлаждение при 4°C в течение 1 минуты.
- 6 Для анализа и документирования полученных результатов использовать программу для управления прибором, сбора данных, контроля качества и автоматического анализа файлов фрагментного анализа, встроенную в генетический анализатор.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ УЧАСТКОВ ГЕНОВ DMPK, CNBP, AR, C9ORF72, RABPN1

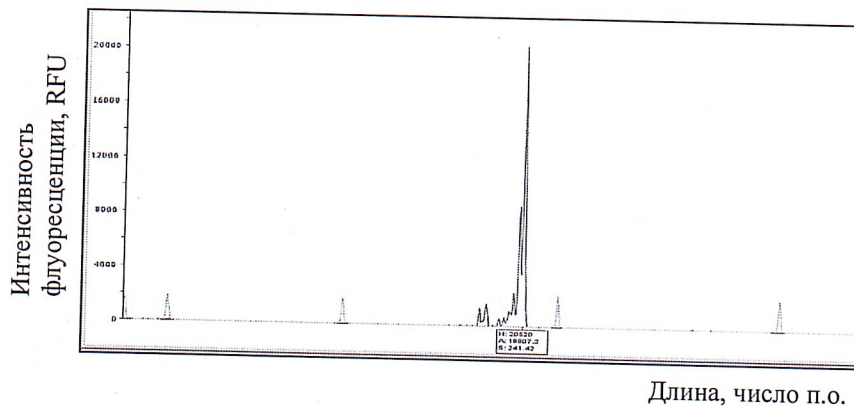
1 Интерпретация результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена RABPN1

Интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена RABPN1 следует осуществлять на основании количественной оценки.

Для расчета числа GCN повторов в гене RABPN1 в исследуемых образцах использовать формулу:

$$N = (L - 215) / 3$$

где N – число повторов GCN, L – длина ПЦР-продукта в парах оснований (п.о.), 215 – длина части ПЦР-продукта, не содержащей повторы GCN, 3 – число нуклеотидов в повторе.



Примечание: фрагмент длиной 241 п.о. (9 повторов GCN)

Рисунок 1 – Продукты амплификации фрагмента первого экзона гена RABPN1 в контрольном образце

2 Интерпретация результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена DMPK

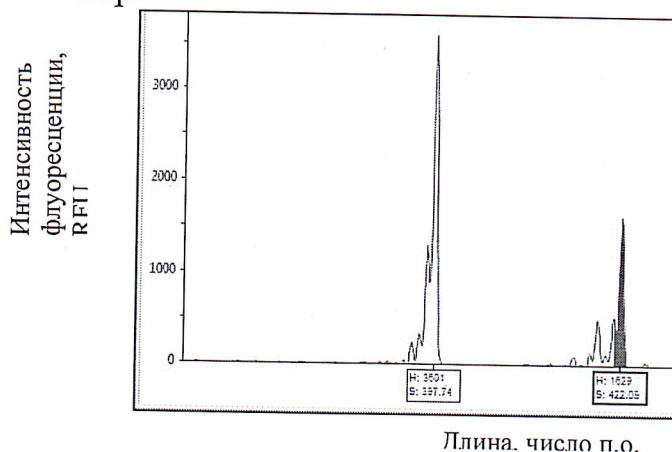
Интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена DMPK следует осуществлять на основании количественной и визуальной оценки. Количественную оценку использовать при детекции аллелей с нормальным числом повторов, визуальную – при детекции экспандированных аллелей.



Для расчета числа СТG повторов в гене DMPK в исследуемых образцах использовать формулу:

$$N = (L - 356) / 3$$

где N – число повторов СТG, L – длина ПЦР-продукта в п.о., 356 – длина части ПЦР-продукта, не содержащей повторы СТG, 3 – число нуклеотидов в повторе.



Примечание: фрагменты длиной 397 п.о. и 422 п.о. (14 и 22 повтора)

Рисунок 2 – Продукты амплификации фрагмента 3'-нетранслируемой области гена DMPK, содержащей повторы СТG в контрольном образце

При наличии экспансии повторов СТG в 3'-нетранслируемой области гена DMPK на электрофореграмме виден характерный паттерн, представленный на рисунке 3Б, на рисунке 3А – электрофореграмма продуктов амплификации 3'-некодируемой области гена DMPK в контрольном образце

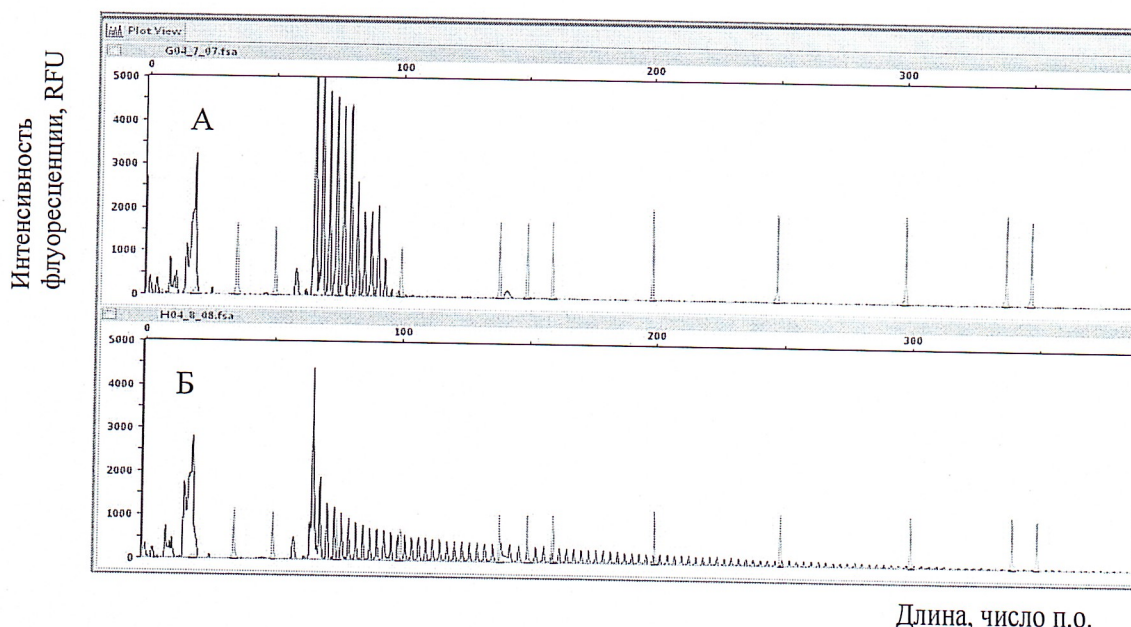


Рисунок 3 – Продукты амплификации 3'-некодируемой области гена DMPK в контрольном образце (А) и у пациента со взрослой классической формой МД1 (Б)

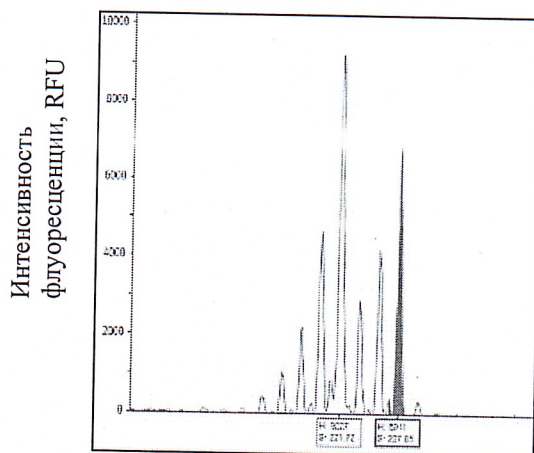
3 Интерпретация результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена CNBP (ZNF9)

Интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена CNBP (ZNF9) следует осуществлять на основании количественной и визуальной оценки. Количественную оценку использовать при детекции аллелей с нормальным числом повторов, визуальную – при детекции экспандированных аллелей.

Для расчета числа ССТГ повторов в гене CNBP (ZNF9) в исследуемых образцах использовать формулу:

$$N=(L-160)/4$$

где N – число повторов ССТГ, L – длина ПЦР-продукта в п.о., 160 – длина части ПЦР-продукта, не содержащей повторы ССТГ, 4 – число нуклеотидов в повторе.



Длина, число п.о.

Примечание: фрагменты длиной 221 п.о. и 228 п.о. (15 и 17 повторов)

Рисунок 4 – Продукты амплификации участка гена CNBP, содержащей повторы ССТГ в контрольном образце

При наличии экспансии повторов в интроне 1 гена CNBP (ZNF9) на электрофореграмме обнаруживается характерный паттерн, представленный на рисунке 5Б, на рисунке 5А – электрофореграмма продуктов амплификации 1 интрона гена CNBP в контрольном образце.



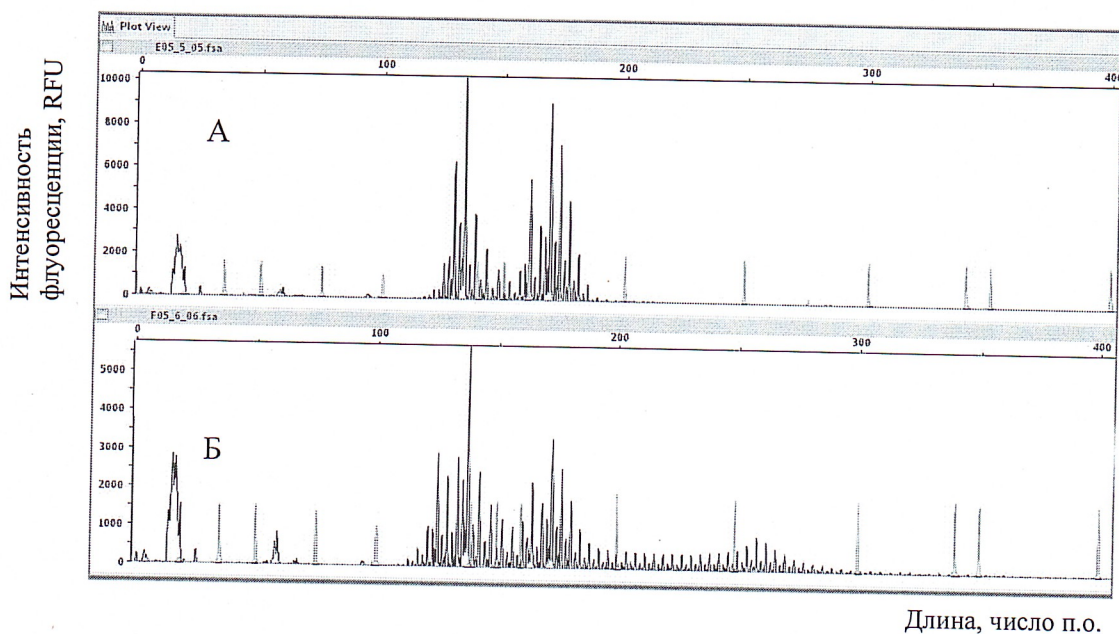


Рисунок 5 – Продукты амплификации 1 интрона гена CNBP в контрольном образце (А) и у пациента с МД2 (Б)

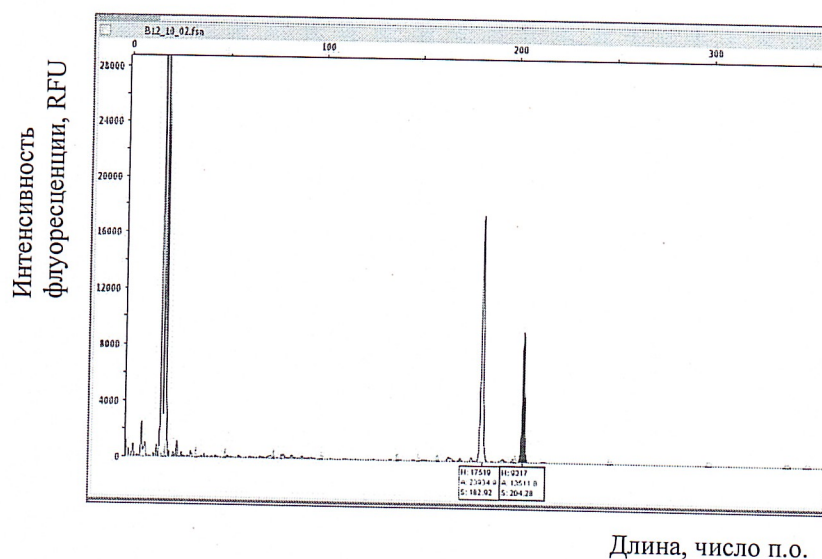
#### 4 Интерпретация результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена C9orf72

Интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена C9orf72 следует осуществлять на основании количественной и визуальной оценки. Количественную оценку использовать при детекции аллелей с нормальным числом повторов, визуальную – при детекции экспандированных аллелей. Для расчета числа GGGGCC повторов в гене C9orf72 в исследуемых образцах использовать формулу:

$$N = (L - 140) / 6$$

где N – число повторов GGGGCC, L – длина ПЦР-продукта в п.о., 140 – длина части ПЦР-продукта, не содержащей повторы GGGGCC, 6 – число нуклеотидов в повторе.

Продукты амплификации фрагмента гена C9orf72, содержащего повторы GGGGCC, полученные в ходе классической и трехпраймерной ПЦР в контрольном образце и образце ДНК пациента с боковым амиотрофическим склерозом представлены на рисунках 6, 7 и 8.



Примечание: Фрагменты 183 п.о. и 204 п.о. (нормальные аллели)  
 Рисунок 6 – Продукты амплификации фрагмента гена *C9orf72*, содержащего повторы GGGGCC в контрольном образце (классическая ПЦР)

При детекции экспандированных аллелей при наличии экспансии повторов GGGGCC повторов в гене *C9orf72* на электрофореграмме обнаруживается характерный паттерн, представленный на рисунке 8 на рисунке 9 – электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента гена *C9orf72*, содержащего повторы GGGGCC, в контрольном образце.

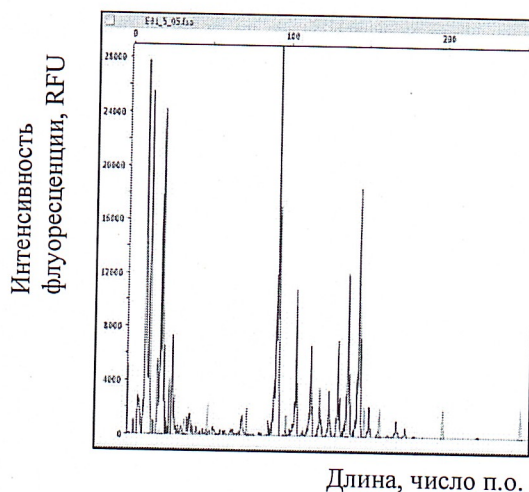


Рисунок 7 – Продукты амплификации фрагмента гена *C9orf72*, содержащего повторы GGGGCC в контрольном образце



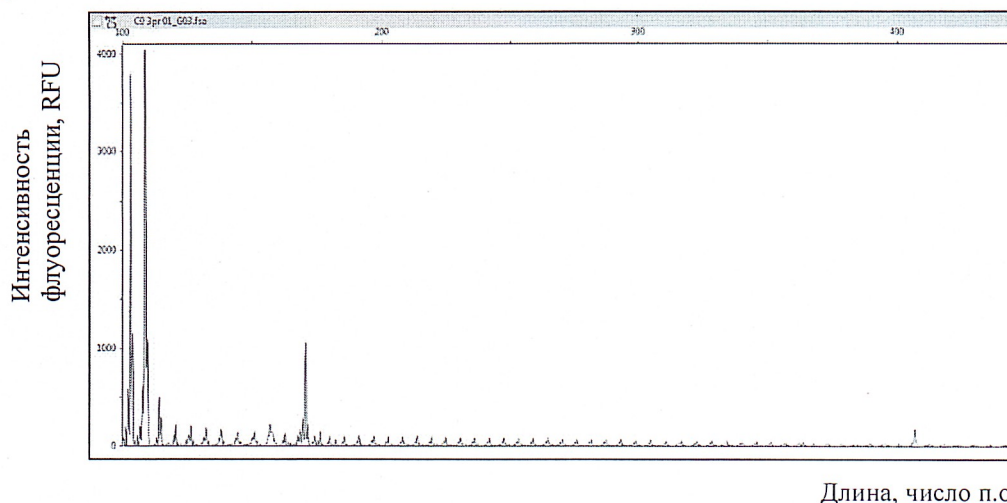


Рисунок 8 – Продукты амплификации фрагмента гена *C9orf72*, содержащего экспансию повторов GGGGCC, в образце ДНК пациента с боковым амиотрофическим склерозом

## 5 Интерпретация результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена AR

Интерпретацию результатов детекции продуктов амплификации содержащего повторы участка гена AR следует осуществлять на основании количественной оценки.

Для расчета числа CAG повторов в гене AR в исследуемых образцах использовать формулу:

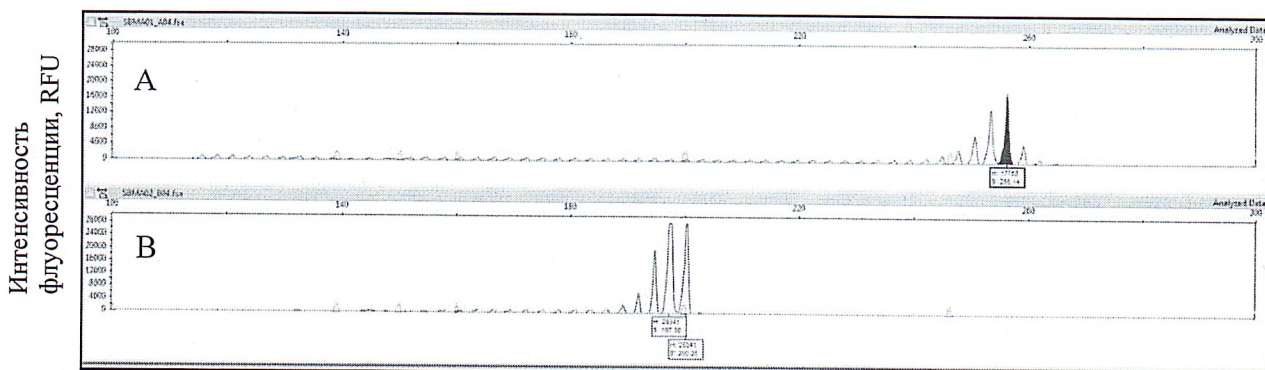
$$N=(L-137)/3$$

где N – число повторов CAG, L – длина ПЦР-продукта в п.о., 137 – длина части ПЦР –продукта, не содержащей повторы CAG, 3 – число нуклеотидов в повторе.

На рисунке 9 показаны электрофореграммы продуктов амплификации фрагмента первого экзона гена AR у пациента мужского пола с бульбоспинальной мышечной атрофии Кеннеди и в контрольном образце, полученном от лица женского пола.

У лиц мужского пола на электрофореграмме визуализируется один сигнал как показано на рисунке 9А.

У лиц женского пола визуализируется один либо два сигнала, как показано на рисунках 9В, 10.



Длина, число п.о.

Примечание: А – фрагмент длиной 256 п.о. (40 повторов, экспансия) у пациента с бульбоспинальной мышечной атрофии Кеннеди. В – фрагменты 197 п.о. и 200 п.о. (20 и 21 повтор, нормальные аллели) в контрольном образце

Рисунок 9 – Продукты амплификации фрагмента первого экзона гена AR у пациента с бульбоспинальной мышечной атрофии Кеннеди (А) и в контрольном образце от лица женского пола (В)



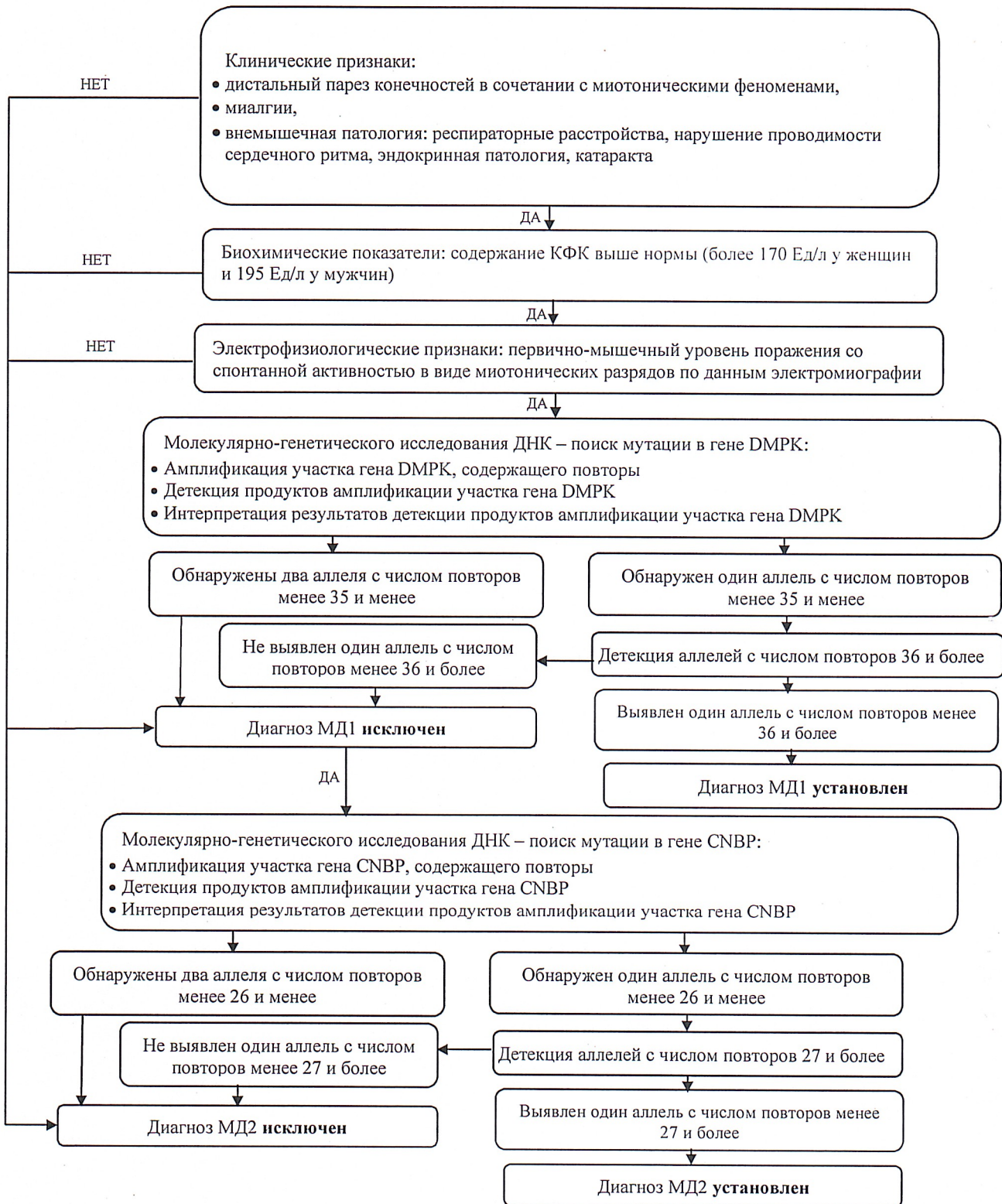
Длина, число п.о.

Примечание: А, В – фрагменты длиной 191 п.о. (18 повторов, нормальный аллель) и 252 п.о. (38 повторов, экспансия повторов) у пациенток гетерозиготных носительниц экспансии. С – фрагмент 191 (18 повторов, нормальный аллель) в контрольном образце

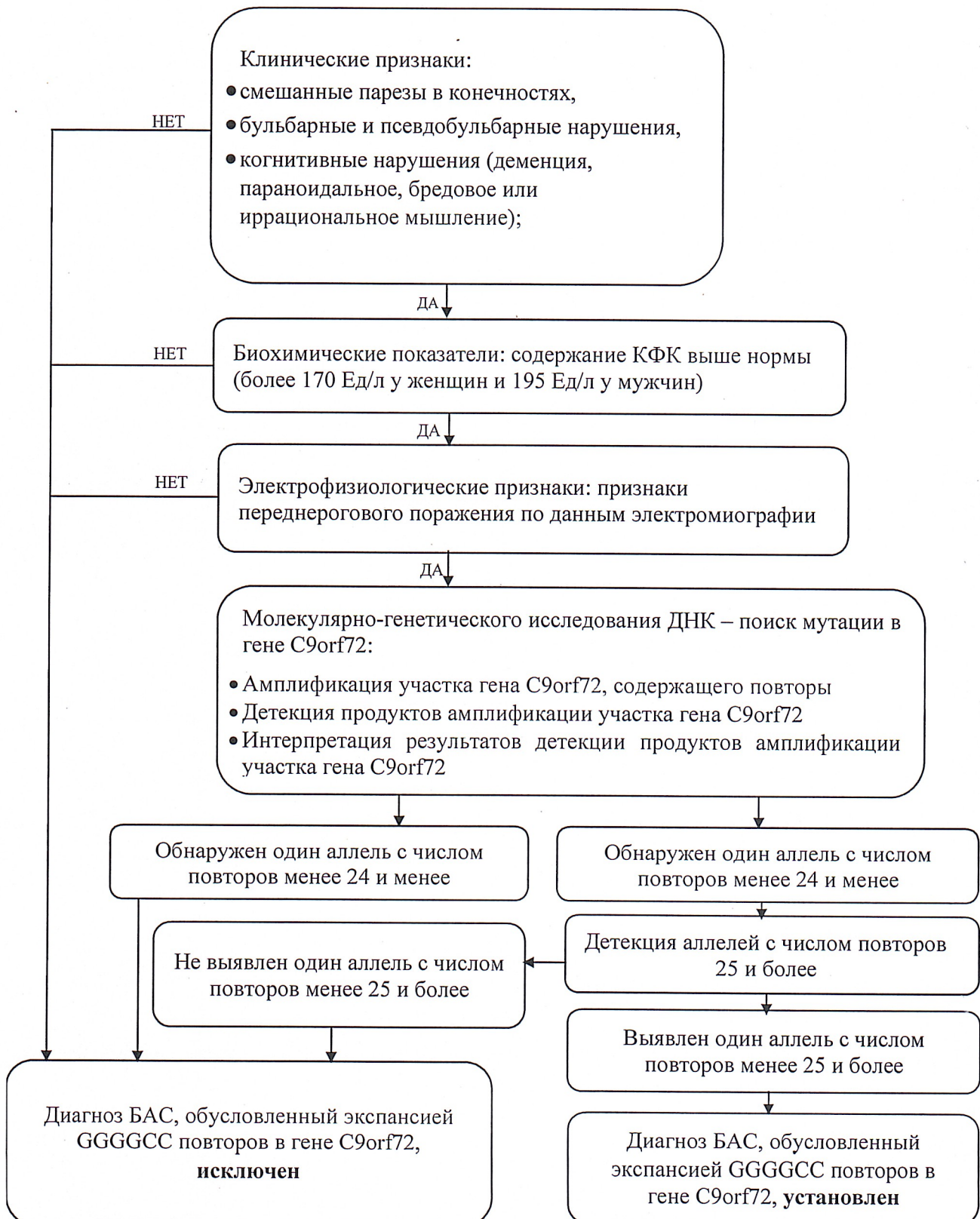
Рисунок 10 – Продукты амплификации фрагмента первого экзона гена AR у пациенток носительниц экспансии в гетерозиготном состоянии (А, В) и в контрольном образце от лица женского пола гомозиготного носителя аллеля с нормальным числом повторов (С)



Алгоритм диагностики миотонических расстройств, обусловленных динамическими мутациями (миотоническая дистрофия)



Алгоритм диагностики болезни двигательного нейрона, обусловленной динамическими мутациями (боковой амиотрофический склероз, обусловленный мутацией в гене C9orf72)





Алгоритм других спинальных мышечных атрофий и родственных синдромов, обусловленных динамическими мутациями (бульбоспинальная мышечная атрофия Кеннеди)

