

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
6 марта 2008 г.
Регистрационный № 091-1006

**ДИАГНОСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, ПРИВОДЯЩИХ
К НАРУШЕНИЮ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У МУЖЧИН**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-
практический центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. К.У. Вильчук, канд. биол. наук Н.И. Моссэ,
канд. биол. наук К.А. Моссэ

Минск 2008

В последние годы появилась необходимость генетического обследования пациентов с различными формами бесплодия. В частности, установлено, что мужчины с диагнозами азооспермия и врожденное двустороннее отсутствие семявыводящих протоков (ВДОСП) во многих случаях являются носителями мутаций в гене трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза (ТРБМ) и имеют значительно более высокий, чем в популяции, риск рождения детей с муковисцидозом (МВ).

Причиной развития, азооспермии и ВДОСП может быть также наличие определенного аллельного варианта политимидинового тракта интрона 8 гена ТРБМ. Данная последовательность может содержать 5, 7 или 9 тимидиновых оснований (аллели 5Т, 7Т, 9Т). Обнаружено, что если ген имеет аллель 5Т, происходит синтез измененной РНК, в результате чего продукция нормального белка составляет менее 10%. В связи с этим во многих странах молекулярно-генетическое исследование гена ТРБМ рекомендовано включать в программу обследования пациентов с бесплодием.

Принцип метода

Для идентификации мутаций и аллельного полиморфизма используется амплификация специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обычными или аллель-специфическими праймерами. Анализ продуктов ПЦР проводится с помощью автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием.

Биологический материал

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, и небольшие фрагменты пятен крови, высушенных на специальных бланках.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Молекулярно-генетический анализ наиболее частых мутаций и аллельных вариантов политимидиновой последовательности интрона 8 в гене ТРБМ может быть рекомендован:

- пациентам с азооспермией не уточненного генеза (отбор пациентов проводится с учетом диагноза, установленного на основании общего и специального андрологического исследования, двукратного стандартного исследования спермы (менее 1 млн сперматозоидов в 1 мл) и определения уровня половых гормонов в сыворотке крови).
- пациентам с ВДОСП (клинический диагноз должен быть подтвержден результатами трансректальной ультрасонографии).
- ближайшим родственникам и в первую очередь родным сибсам (при выявлении носительства мутации у пациента). Полученная информация используется для медико-генетического консультирования при планировании семьи и рождении ребенка, что является одной из основных мер профилактики МВ.
- семьям, нуждающимся во вспомогательных репродуктивных технологиях. Генетическое обследование и консультирование необходимо

для оценки риска передачи потомству генетических нарушений репродуктивной функции.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ dF508, 2184insA И CFTRdel2,3(21KB) ГЕНА ТРБМ

Перечень необходимого оборудования и реактивов

Проведение полимеразной цепной реакции

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 mM MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), праймеры, фланкирующие участок ДНК, содержащий анализируемый полиморфизм, бидистиллированная деионизированная вода.

Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании в автоматическом анализаторе используются меченные варианты прямых праймеров **370**, **2,3F**, **13F**, имеющие молекулу «репортера» 6-FAM на 3' конце.

Таблица

Последовательность и концентрация праймеров, использованных в методике

Мутация	Последовательность праймеров	Концентрация
dF508	370: GTCTGATATGCTGCAC-FAM 371: GTCCATGCTGATGATGCTC	1 пмоль/мкл 0,8 пмоль/мкл
CFTRdel2,3	2,3F: GAGCTTCTGAAATTAATTGACCAC-FAM 2,3R: GAACCCATCATAGGATACAATG	6 пмоль/мкл 7,5 пмоль/мкл
2184insA	13F: ATGGGATGTGATTCTTTCTGA-FAM 13R: TCGTATAGAGTTGATTGGAT	3 пмоль/мкл 3 пмоль/мкл

Проведение автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием

Материалы и оборудование: генетический анализатор ABI PRISM 310 (или аналогичный прибор), программируемый термостат, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: маркер молекулярного веса LIZ500 или ROX350, деионизированный формамид, 4% раствор полимера POP-4TM, 10X ЭДТА буфер, H₂O.

Методика определения аллелей

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/dTTP/dGTP, праймеры в соответствующей концентрации (табл.) и 1 единицу активности полимеразы.

2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и образец ДНК. При работе в амплификаторах, не имеющих горячей крышки, добавить сверху каплю минерального масла для предотвращения испарения жидкости во время ПЦР.

3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95 °С. Затем выполнить 35 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 40 с денатурации при 95 °С, 1 мин отжига при 57 °С и 1 мин синтеза при 72 °С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдержать 5 мин при 72 °С.

4. После окончания ПЦР пробы поместить в холодильник.

Проведение автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием

Подготовку к работе генетического анализатора ABI PRISM 310 выполнить в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ производить при следующих параметрах:

- длина капилляра 41 см;
- заполнение капилляра 4% полимером POP-4™;
- температура 60 °С;
- время инъекции образца в капилляр 8 с;
- время разделения 24 мин;
- напряжение 7,5 кВ.

Подготовка проб:

1. В пробирку добавить 1 мкл амплификата из каждой реакции, 0,7 мкл маркера молекулярного веса LIZ500 или ROX350 и 8,5 мкл деионизированного формамида.

2. Пробы денатурировать 2,5 мин при 95 °С.

3. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить во 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

Пара праймеров **2,3F** и **2,3R** фланкирует точки разрыва делеции 2 и 3 экзонов и амплифицирует продукт размером 207 п.н. только в том случае, если в анализируемом образце имеется мутация CFTRdel2,3(21kb). В

нормальных образцах продукт амплификации отсутствует. Пара праймеров **370** и **371** генерирует ДНК-фрагмент 10 экзона длиной 96 п.н. в норме и 93 п.н. при мутации dF508. Данный ДНК-фрагмент также является внутренним контролем амплификации для мутации CFTRdel2,3(21kb). Пара праймеров **13F** и **13R** дает продукт амплификации в 192 п.н. в норме и 193 п.н. при мутации 2184insA (рис. 1).

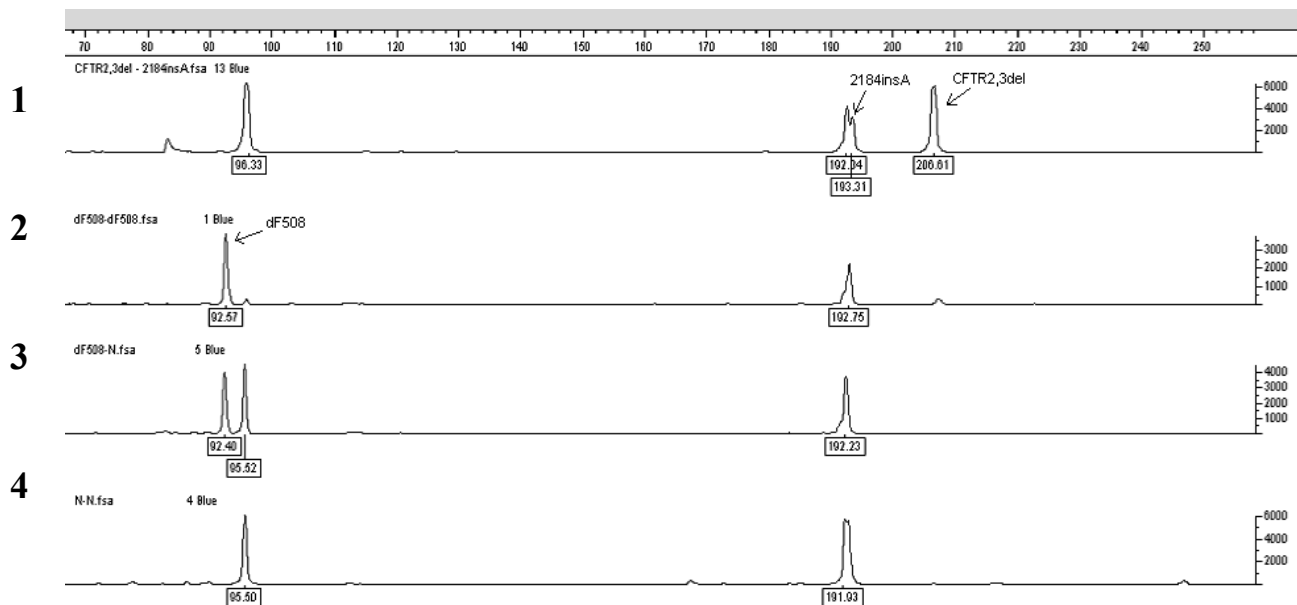


Рис. 1. Результаты анализа образцов ДНК на мутации dF508, CFTRdel2,3(21kb) и 2184insA: 1 — в образце выявлены мутации CFTRdel2,3(21kb) и 2184insA; 2 — dF508/dF508; 3 — dF508/N; 4 — N/N

ИДЕНТИФИКАЦИИ АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМА ПОЛИТИМИДИНОВОГО ТРАКТА ИНТРОНА 8 ГЕНА ТРБМ

Перечень необходимого оборудования и реактивов

Аналогично предыдущему разделу, за исключением праймеров.

Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании в автоматическом анализаторе используется меченный вариант прямого праймера **I9D9**, имеющий молекулу «репортера» 6-FAM на 3' конце. Последовательность праймеров:

1. **I9D9** 5'-CCGCCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTTT-FAM-3'
2. **E9R2** 5'-GGATCCAGCAACCGCCAACA-3'.

Методика определения аллелей

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 мкM dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пM каждого праймера и 0,75 единиц активности полимеразы.

2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и образец ДНК, затем добавить сверху 1 каплю минерального масла для предотвращения испарения жидкости во время ПЦР.

3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 минут при 95 °С. Затем выполнить 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 95 °С, 30 с отжига при 54 °С и 40 с синтеза при 72 °С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдержать 6 мин при 72 °С.

4. После окончания ПЦР пробы поместить в холодильник.

Автоматический капиллярный электрофорез с полихромным лазерным сканированием

Подготовку к работе генетического анализатора ABI PRISM 310 выполнить в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ производить при следующих параметрах:

- длина капилляра 41 см;
- заполнение капилляра 4 % полимером POP-4™;
- температура 60 °С;
- время инъекции образца в капилляр 5 с;
- время разделения 24 мин;
- напряжение 7,5 кВ.

Подготовка проб:

1. В пробирку добавить 0,5 мкл амплификата из каждой реакции, 0,5 мкл маркера молекулярного веса LIZ500 или ROX350 и 11 мкл деионизированного формамида.

2. Пробы денатурировать 4 мин при 95 °С.

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

4. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.

5. Перенести весь объем пробы в микропробирки.

Анализ проб:

Аналогично предыдущему разделу.

Интерпретация полученных данных

Аллели определяют по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа (рис. 2). Продукт ПЦР размером 204 п.н. амплифицируется в том случае, если в анализируемом образце присутствует аллель с 9 тимидиновыми основаниями (9Т). Аллели 7Т и 5Т имеют размер 202 и 200 п.н. соответственно.

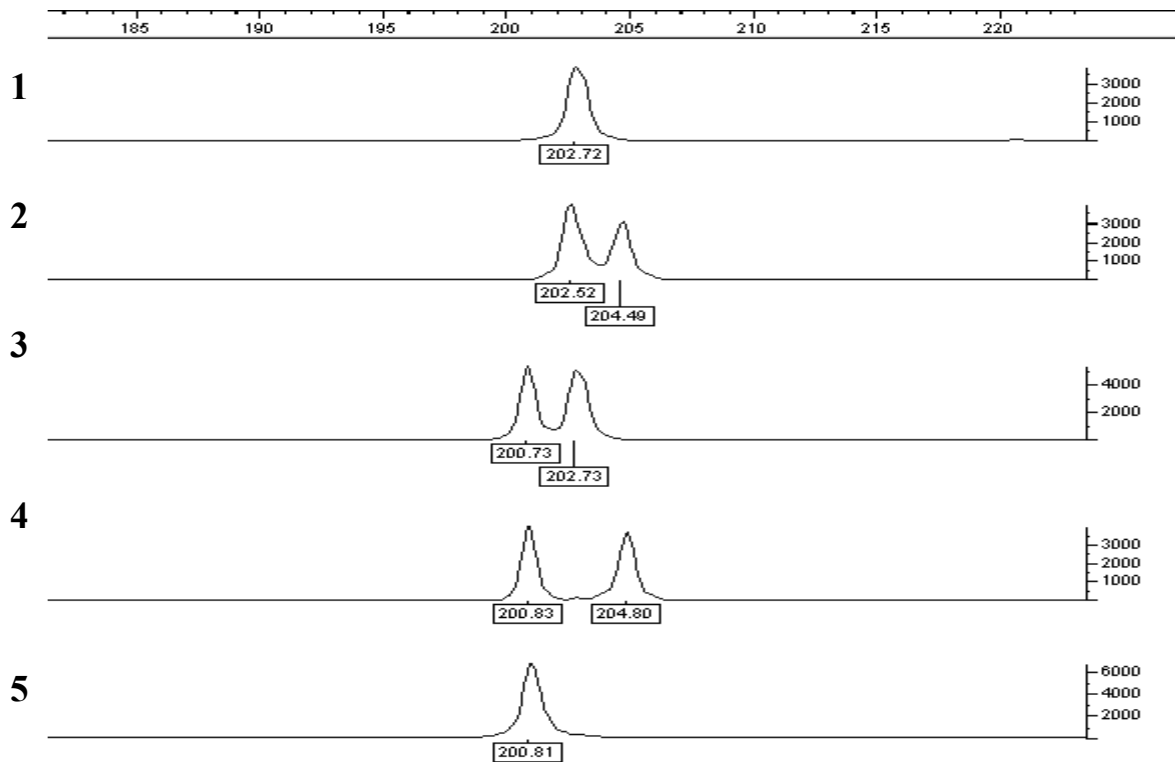


Рис. 2. Варианты генотипа по полиморфизму политимидинового тракта интрона 8 гена ТРБМ: 1 — размер ДНК-фрагментов 202/202 (аллели 7/7); 2 — размер ДНК-фрагментов 202/204 (аллели 7/9); 3 — размер ДНК-фрагментов 200/202 (аллели 5/7); 4 — размер ДНК-фрагментов 200/204 (аллели 5/9); 5 — размер ДНК-фрагментов 200/200 (аллели 5/5)

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 возможных диагностических ошибок требуется соблюдение следующих правил:

- использовать только химически чистую и, желательно, стерильную посуду;
- после работы с каждым объектом инструмент и используемые поверхности лабораторных столов протирают 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:

- 1) в зоне экстрагирования ДНК 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) в зоне анализа продуктов ПЦР проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.