

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
18 декабря 2009 г.
Регистрационный № 092-0909

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ
С РАЗВИТИЕМ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: Т.В. Осадчук, канд. биол. наук К.А. Моссэ, канд. биол. наук
Н.И. Моссэ, канд. мед. наук И.В. Наумчик, канд. мед. наук Н.В. Румянцева

Минск 2009

Цель инструкции — дифференциальная диагностика невральной амиотрофии Шарко–Мари–Тус типа 1А и 1Х и атаксии Фридрейха путем идентификации мутаций, ассоциированных с развитием данных нейродегенеративных заболеваний.

Область применения: медицинская генетика, неврология. Уровень внедрения: ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», областные медико-генетические центры.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Шарко–Мари–Тус типа 1А: молекулярно-генетический анализ может быть рекомендован пациентам с клиническими признаками невральной амиотрофии, которые имеют поражение периферических нервов (двигательных и чувствительных), слабость и атрофию мышц, нарушение походки и деформации конечностей, а также различные сенсорные нарушения (утрата болевой, тактильной и температурной чувствительности).

Шарко–Мари–Тус типа 1Х: молекулярно-генетический анализ может быть рекомендован пациентам с клиническими признаками, аналогичными Шарко–Мари–Тус типа 1А с учетом возможного Х-сцепленного типа наследования, а также с диффузной мышечной атрофией голеней, дистальным парезом верхних и нижних конечностей, «степажной» походкой.

Атаксия Фридрейха: молекулярно-генетический анализ может быть рекомендован пациентам со следующими клиническими признаками: аутосомно-рецессивный тип наследования; начало заболевания до 25 лет; прогрессирующая атаксия; отсутствие сухожильных рефлексов в ногах; электрофизиологические признаки аксональной сенсорной невропатии (в течение 5 лет от начала заболевания); дизартрия; арефлексия; утрата глубокой чувствительности в дистальных отделах конечностей; пирамидальная слабость в ногах, в совокупности с экстраневральными проявлениями (кардиомиопатия, сахарный диабет, гипогонадизм, инфантилизм, ожирение, дисфункция яичников).

Алгоритм ДНК-диагностики трех наиболее частых форм прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний отображен на рис. 1.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

Алгоритм ДНК-диагностики наиболее частых форм прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний

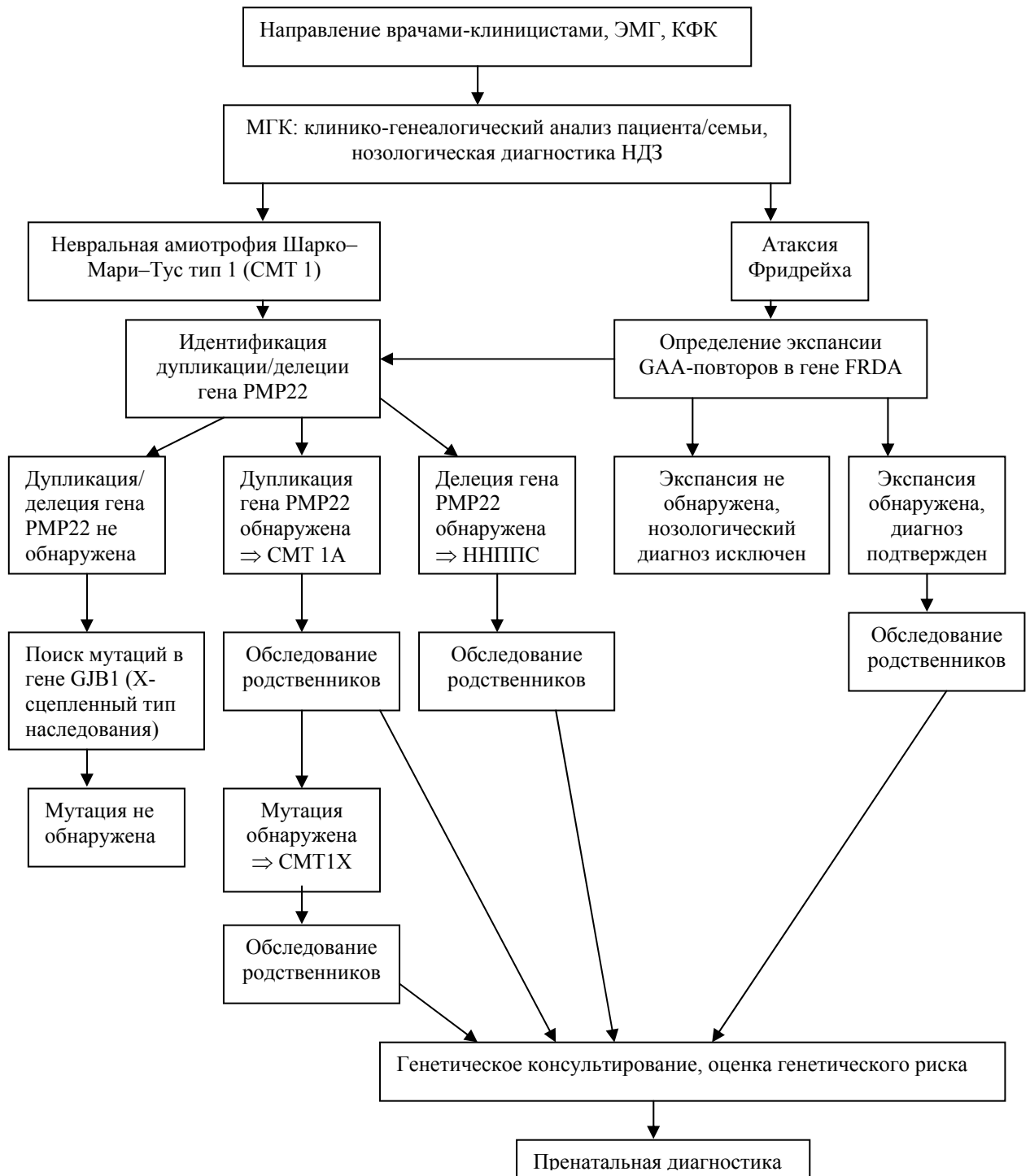


Рис. 1. Алгоритм ДНК-диагностики наиболее частых форм прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ ВНУТРИЛОКУСНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНА RMP22 ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НЕВРАЛЬНОЙ АМИОТРОФИИ ШАРКО–МАРИ–ТУС ТИП 1А

Перечень необходимого оборудования и реактивов

Биологический материал

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

Полимеразная цепная реакция (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 mM MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), праймеры, фланкирующие участок ДНК, содержащий анализируемый полиморфизм, бидистиллированная деионизированная вода (H₂O).

Для амплификации ДНК-маркеров D17S2218, D17S2223 и D17S2229 использовали три пары праймеров, меченных флюоресцентными молекулами «репортера» FAM:

D17S2223 F-TACAAGAAAGGGAACAAAGC
R-GTGTCTTTGAAGAAGCAAGAGACGAGT
D17S2218 F-AAATGCTTGTGGATTAGTTG
R-GTGTCTTGGGTACCTTTATGTTTTCTT
D17S2229 F-CCCATTCCATAGTCATCAGA
R-GTGTCTTTGCCATTTTACCACAAGAGG

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, 4% раствор полимера для заполнения капилляра, 10X ЭДТА буфер, H₂O.

Методика определения дупликации гена RMP22

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, по 10 пМ праймеров и 0,75 единиц 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 °С. Затем выполняется 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 95 °С,

30 с отжига при 56 °С и 30 с синтеза при 72 °С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72 °С.

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.

Анализ производить при следующих параметрах:

- длина капилляра 36 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура 60 °С;
- время инъекции образца в капилляр 5 с;
- время разделения 24 мин;
- напряжение 7,5 кВ.

Подготовка проб:

1. В микропробирку добавить 0,5 мкл амплификата из каждой реакции, 0,5 мкл маркера молекулярного веса 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 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.

5. Проанализировать полученные данные.

Интерпретация полученных данных

Дупликацию определяют по наличию трех копий фрагментов ДНК, зафиксированных в процессе анализа, а также по наличию дозового эффекта — двойного по интенсивности сигнала совпадающих по размеру аллелей по отношению к интенсивности сигнала третьего аллеля (рис. 2).

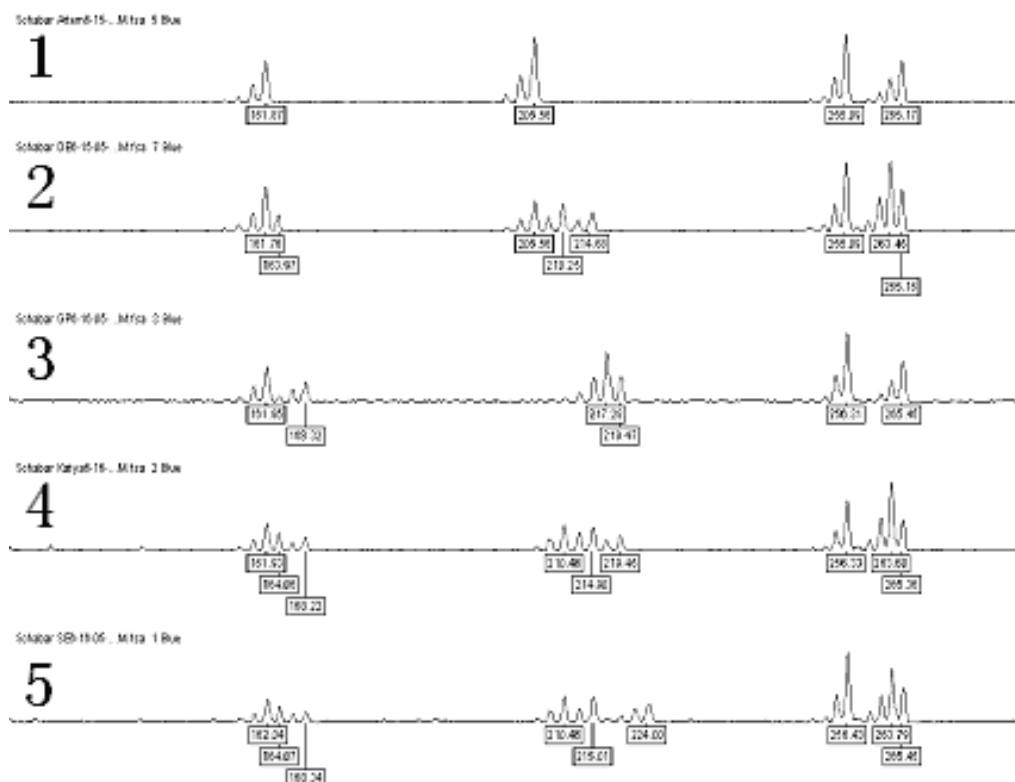


Рис. 2. Варианты генотипа по маркерам D17S2223, D17S2218, D17S2229 гена PMP22: 1 — норма; 2 — дупликация по маркерам D17S2218 и D17S2229, дозовый эффект по маркеру D17S2223; 3 — норма; 4 — дупликация по трем маркерам; 5 — дупликация по трем маркерам

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ КОННЕКСИНА-32 У ПАЦИЕНТОВ С НЕВРАЛЬНОЙ АМИОТРОФИЕЙ ШАРКО–МАРИ–ТУС ТИП 1Х

Перечень необходимого оборудования и реактивов

Биологический материал

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

Полимеразная цепная реакция

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

Последовательности праймеров для синтеза фрагментов 2-го экзона гена коннексина-32:

Cx1 TGA GGC AGG ATG AAC TGG ACA GGT

Cx2 TTG CTG GTG AGC CAC GTG CAT GGC

Cx3 ATC TCC CAT GTG CGG CTG TGG TCC

Cx5 GAT GAT GAG GTA CAC CAC CT
CxS1 CGT CTT CAT GCT AGC TGC CTC TGG
CxA1 TGG CAG GTT GCC TGG TAT GT

Проведение денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC)

Материалы и оборудование: Жидкостной хроматограф в комплектации, позволяющей выполнять анализ по технологии DHPLC, рН-метр, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: триэтиламин, ацетонитрил, Na₂EDTA, ледяная уксусная кислота, бидистиллированная вода.

Секвенирующая реакция

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: набор для сиквенса, 5X буфер для сиквенса, прямой праймер, бидистиллированная вода.

Автоматический капиллярный электрофорез

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

Реактивы: формамид, 4% раствор полимера для заполнения капилляра, 10X ЭДТА буфер, бидистиллированная вода.

Методика определения аллелей

Проведение ПЦР

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1хПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пМ праймеров и 0,75 единиц 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 °С. Затем выполняется 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 95 °С, 1 мин отжига при 62 °С и 1 мин синтеза при 72 °С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72 °С.

4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

Проведение денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC)

Приготовление буферных растворов:

Буфер А (рН 7,0): триэтиламин — 14 мл, Na₂EDTA — 0,037 г (Na₂EDTA×2H₂O — 0,041 г), добавить 800 мл бидистиллированной воды, рН довести ледяной уксусной кислотой, довести до 1 л бидистиллированной водой.

Буфер В (рН 7,0): триэтиламин — 14 мл, Na₂EDTA — 0,037 г (Na₂EDTA×2H₂O — 0,041 г), добавить 600 мл бидистиллированной воды, рН довести ледяной уксусной кислотой, ацетонитрил — 250 мл, довести до 1 л бидистиллированной водой.

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

Анализ производить при следующих параметрах:

- скорость буферного потока 0,45 мл/мин;
- температура колонки 57 °С;
- время инъекции образца в колонку 5 с;
- время разделения 8 мин.

Секвенирующая реакция

В пробирки для ПЦР внести по 4 мкл секвенирующей смеси, 2 мкл секвенирующего буфера, 2 пмоль прямого праймера, 4 мкл ПЦР-продукта и бидистиллированной воды до 20 мкл.

Пробирки поместить в амплификатор и провести 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 10 с денатурации при 96 °С, 4 мин отжига и синтеза при 60 °С.

После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

Автоматический капиллярный электрофорез

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

Анализ производить при следующих параметрах:

- длина капилляра 36 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура 50 °С;
- время инъекции образца в капилляр 5 с;
- время разделения 32 мин;
- напряжение 11 кВ.

Подготовка проб:

1. В пробирку с высушенным продуктом секвенирующей реакции добавить 15 мкл формамида.

2. Встряхивать на вортексе до полного растворения.

3. Пробы денатурировать 2 мин при 95 °С.

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

5. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.

6. 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

При выполнении денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии наличие изменений в нуклеотидной последовательности определяют по присутствию дополнительных пиков на хроматограмме или изменению ее профиля.

При выполнении прямого секвенирования идентификацию мутаций проводят исходя из зафиксированных изменений в последовательности нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК (рис. 3).

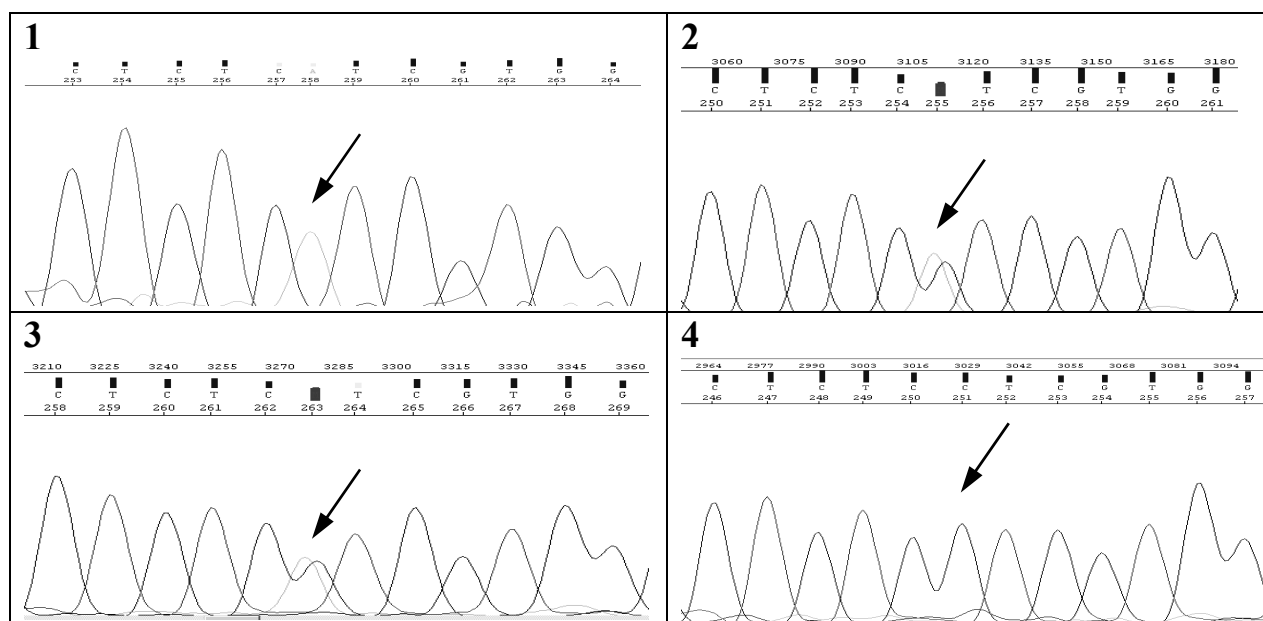


Рис. 3. Результаты секвенирования второго экзона гена *Sx32*: 1 — мутация; 2 — мутация в гетерозиготном состоянии; 3 — мутация в гетерозиготном состоянии; 4 — норма. Стрелкой отмечено место нуклеотидной замены

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИНУКЛЕОТИДНЫХ GAA-ПОВТОРОВ ГЕНА *FRDA* ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АТАКСИИ ФРИДРЕЙХА

Перечень необходимого оборудования и реактивов

Биологический материал

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

Полимеразная цепная реакция

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 полимеразы, соответствующий 10X буфер для ПЦР, 25 mM MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), праймеры, фланкирующие участок ДНК, содержащий анализируемый полиморфизм, бидистиллированная деионизированная вода (H₂O).

Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании в автоматическом анализаторе использовали меченый вариант прямого праймера, имевшего молекулу «репортера» 6-FAM на 5' конце. Последовательность праймеров:

GAA F: **6-FAM** GGG ATT GGT TGC CAG TGC TTA AAA GTT AG

GAA R: GAT CTA AGG ACC ATC ATG GCC ACA CTT GCC

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 для заполнения капилляра, 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 мкM dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пM праймеров и 0,75 единиц 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 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 95 °C, 1 мин отжига при 65 °C и 1 мин синтеза при 72 °C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72 °C.

4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

Автоматический капиллярный электрофорез с полихромным лазерным сканированием

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

Анализ производить при следующих параметрах:

- длина капилляра 36 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура 60 °C;
- время инъекции образца в капилляр 5 с;
- время разделения 28 мин;
- напряжение 7,5 кВ.

Подготовка проб:

1. В микропробирку добавить 0,5 мкл амплификата из каждой реакции, 0,5 мкл маркера молекулярного веса и 11 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.
5. Проанализировать полученные данные.

Интерпретация полученных данных

Определение аллелей проводят по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа (рис. 4).

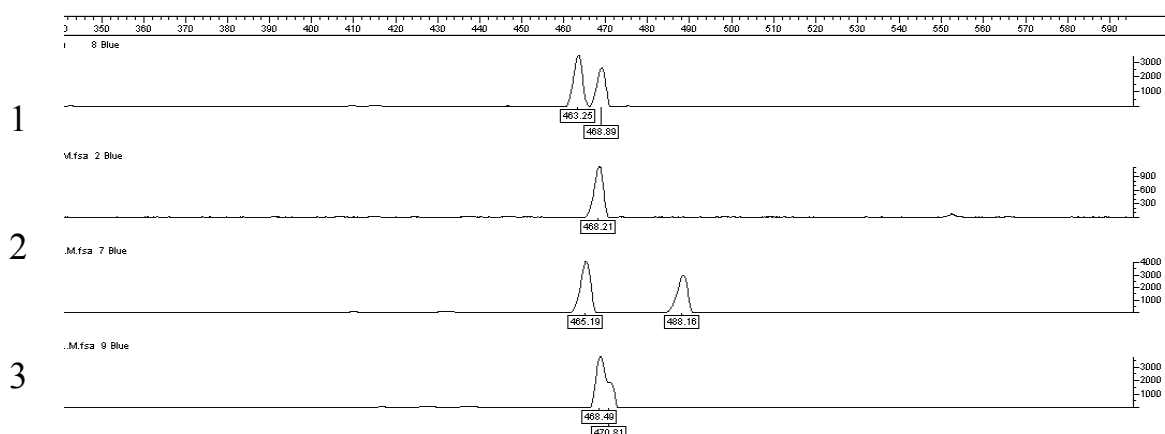


Рис. 4. Варианты аллелей гена FRDA, обнаруженные в ходе исследования. Образцы 1, 3, 4 — гетерозиготное носительство аллелей; 2 — гомозигота. В образце 4 пары аллелей отличаются по длине на один GAA-повтор

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;
- 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 отрицательный контроль;
- при выделении ДНК и постановке ПЦР работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

В лаборатории необходимо выделять несколько зон:

- в зоне экстрагирования ДНК 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.

- В зоне анализа продуктов ПЦР проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.