

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть  
6 марта 2008 г.  
Регистрационный № 092-1006

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СЕМЕЙНОЙ  
ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ**

инструкция по применению

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

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

Минск 2008

Первичная гиперхолестеринемия (ПГ), осложненная атеросклерозом, — причина многих сердечно-сосудистых заболеваний. Моногенной формой заболевания является семейная ПГ, вызванная мутациями либо в гене рецептора липопротеина низкой плотности (ЛПНП), либо в гене, кодирующем белок аполипопротеин В.

Самый частый дефект гена АРОВ, кодирующего белок аполипопротеин В, который приводит к клиническим проявлениям, — это вариант, связанный с мутацией в кодоне 3500 (Arg3500Gln). Соответствующая замена аминокислоты вызывает конформационные изменения белка, нарушение связывания липопротеина низкой плотности с рецептором и в конечном итоге является причиной развития гиперхолестеринемии.

В гене рецептора ЛПНП выявлено несколько различных вариантов последовательности ДНК из-за наличия точечных нуклеотидных замен и микросателлитных повторов. Полученные нами результаты показали ассоциацию одного из вариантов, связанного с полиморфизмом 18 экзона гена рецептора ЛПНП, с повышенным уровнем холестерина. Соответственно генотипирование полиморфизма может быть использовано для выявления групп риска развития ПГ.

#### **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 производится с помощью электрофореза в полиакриламидных гелях и 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 мутаций в гене АРОВ и полиморфизма 18 экзона гена рецептора ЛПНП может быть рекомендован:

- пациентам с клиническими признаками первичной или семейной гиперхолестеринемии. Рекомендуемые критерии гетерозиготной формы СГ: концентрация холестерина сыворотки выше 6,7 ммоль/л у детей до 16 лет или более 7,5 ммоль/л у взрослых, сухожильная ксантома, наличие у пациента родственников первой или второй степени родства с аналогичной патологией;
- родственникам пациентов, у которых выявлен генетический дефект. Учитывая аутосомно-доминантный тип наследования, такой подход, известный как каскадный семейный скрининг, является более эффективным, чем общий или селективный скрининг.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИИ R3500 ГЕНА АРОВ**

### **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 0,5 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: Taq полимераза; соответствующий 10X буфер для ПЦР; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); праймеры, фланкирующие участки ДНК, содержащей анализируемые мутации; бидистиллированная деионизированная вода.

Последовательность праймеров, используемых для идентификации мутации R3500Q гена АРОВ.

**3500F** 5`-GACCACAAGCTTAGCTTGG-3`

**3500R** 5`-GGGTGGCTTTGCTTGTATG-3`

**3500M** 5`-TGCAGCTTCACTGAACACT-3`

#### *Проведение электрофоретического разделения продуктов ПЦР*

Материалы и оборудование: камера для вертикального электрофореза, стекла соответствующего размера (15×15 см), прокладки и гребенка толщиной 0,8 мм, источник постоянного тока, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: бромфеноловый синий, ксиленцианол, 40% сахароза, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, трис, ЭДТА, борная кислота, персульфат аммония, TEMED, маркер молекулярного веса pBR322/MspI, H<sub>2</sub>O.

#### *Окрашивание геля бромистым этидием*

Материалы и оборудование: кювета для окрашивания, трансиллюминатор, камера для фотографирования гелей.

Реактивы: бромистый этидий.

### **Методика определения мутаций**

#### *Проведение ПЦР*

Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл (довести H<sub>2</sub>O) содержит 1xПЦР буфер, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP; по 1 мкМ праймеров 3500F, 3500M и 0,25 мкМ 3500R, 1 ЕД полимеразы.

1. 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.

2. 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 48 °С и 1 мин синтеза при 72 °С. На завершающей

стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72 °С.

3. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

*Проведение электрофоретического разделения продуктов ПЦР*

Приготовление растворов:

- 30% раствор полиакриламида (соотношение мономеров 29:1): 29 г акриламида, 1 г N,N'-метиленабисакриламида, H<sub>2</sub>O до 100 мл;

- 10X TBE буфер: 3,72 г ЭДТА, 27,5 г борной кислоты, 54 г триса, H<sub>2</sub>O до 500 мл;

- 20% персульфат аммония: 0,2 г персульфата, H<sub>2</sub>O до 1 мл;

- 6X буфер для нанесения проб: 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленианол, 40% (вес/объем) сахара.

Метод:

1. Подготовить стекла электрофорезной камеры для заливки геля.

2. Приготовить гель.

Для приготовления 15 мл 10% геля с соотношением мономеров 29:1 смешивают: 5 мл 30% полиакриламида, 1,5 мл 10X TBE, 9,5 мл H<sub>2</sub>O, 60 мкл 20% персульфата аммония, 20 мкл TEMED.

3. Раствор тщательно перемешать, быстро залить между стеклами и вставить гребенку, стараясь не занести пузырьков воздуха. Оставить для полимеризации на 15–20 мин.

4. После полимеризации акриламида удалить гребенку и промыть образовавшиеся лунки 1X TBE.

5. Собрать камеру для электрофореза, заполнить резервуары 1X TBE.

6. В пробирки, содержащие ПЦР продукт, добавить 1/6 объема погружающего буфера.

7. В лунки геля микропипеткой нанести образцы. В крайние левую и правую лунки нанести маркер молекулярного веса.

8. Камеру подключить к источнику тока. Электрофоретическое разделение производить при 320 В.

*Окрашивание геля бромистым этидием*

После окончания электрофореза гель отделяют от стекол и помещают в кювету с раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Окрашивание проводят в течение 5–10 мин. Анализ и фотографирование электрофореграммы производят в УФ-свете.

*Интерпретация полученных данных*

Идентификация мутации R3500Q в гене АРОВ проводится с использованием метода ARMS (amplification refractory mutation system, аллель-специфическая ПЦР). Суть метода заключается в постановке ПЦР, в которой один из обратных праймеров обычный, а вторым является аллель-специфическая мутантная олигонуклеотидная последовательность. При наличии мутации в исследуемой ДНК кроме нормального образуется также дополнительный фрагмент, амплифицированный с участием мутантного праймера. Определение мутаций производят по наличию и положению фрагментов ДНК на электрофореграмме (рис. 1). ДНК фрагмент гена АРОВ размером 334 п.н. синтезируется в нормальных аллелях и фрагмент 167 п.н. в

аллелях с мутацией:

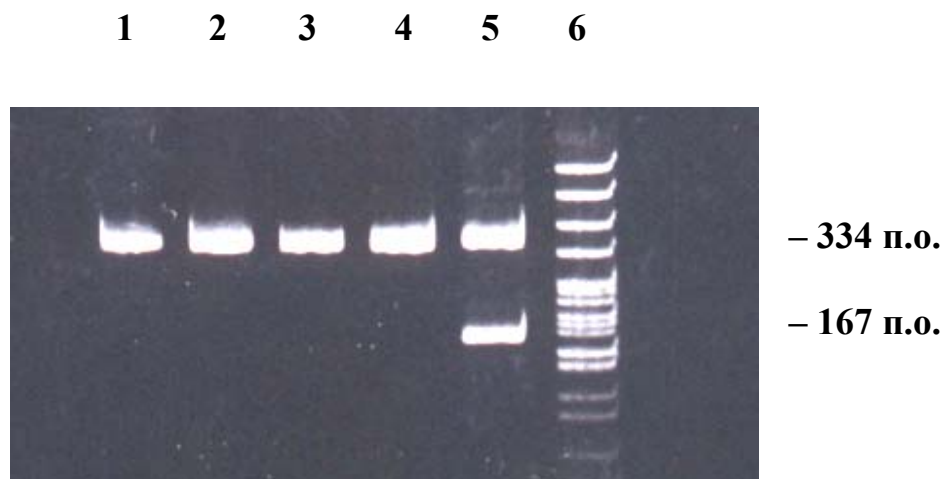


Рис. 1. Определение мутации R3500Q в гене АРОВ. Дорожки 1–4 — нормальные образцы; 5 — контрольный образец с мутацией R3500Q; 6 — маркер молекулярного веса PBR322/MspI

## ИДЕНТИФИКАЦИИ АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМА 18 ЭКЗОНА ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЛПНП

### 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 полимеразы, соответствующий 10X буфер для ПЦР, 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 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 используется меченный вариант прямого праймера GZ7, имеющий молекулу «репортера» 6-FAM на 3' конце. Последовательность праймеров:

1. **GZ7** 5'-CACTTTGTATATTGGTTGAAACTGT-FAM-3'

2. **GZ8** 5'-CACTGAACAAATACAGCAACCAGGG-3'

*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-4<sup>TM</sup>, 10X ЭДТА буфер, H<sub>2</sub>O.

## 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 MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пМ 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 мин при 95 °С. Затем выполняется 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 выдерживаются 6 мин при 72 °С.

4. После окончания ПЦР пробы помещают 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 POP4<sup>TM</sup>;
- 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:

1. Установить штатив в анализатор.

2. Задать необходимые параметры анализа в программе сбора данных.

3. Запустить программу сбора данных.

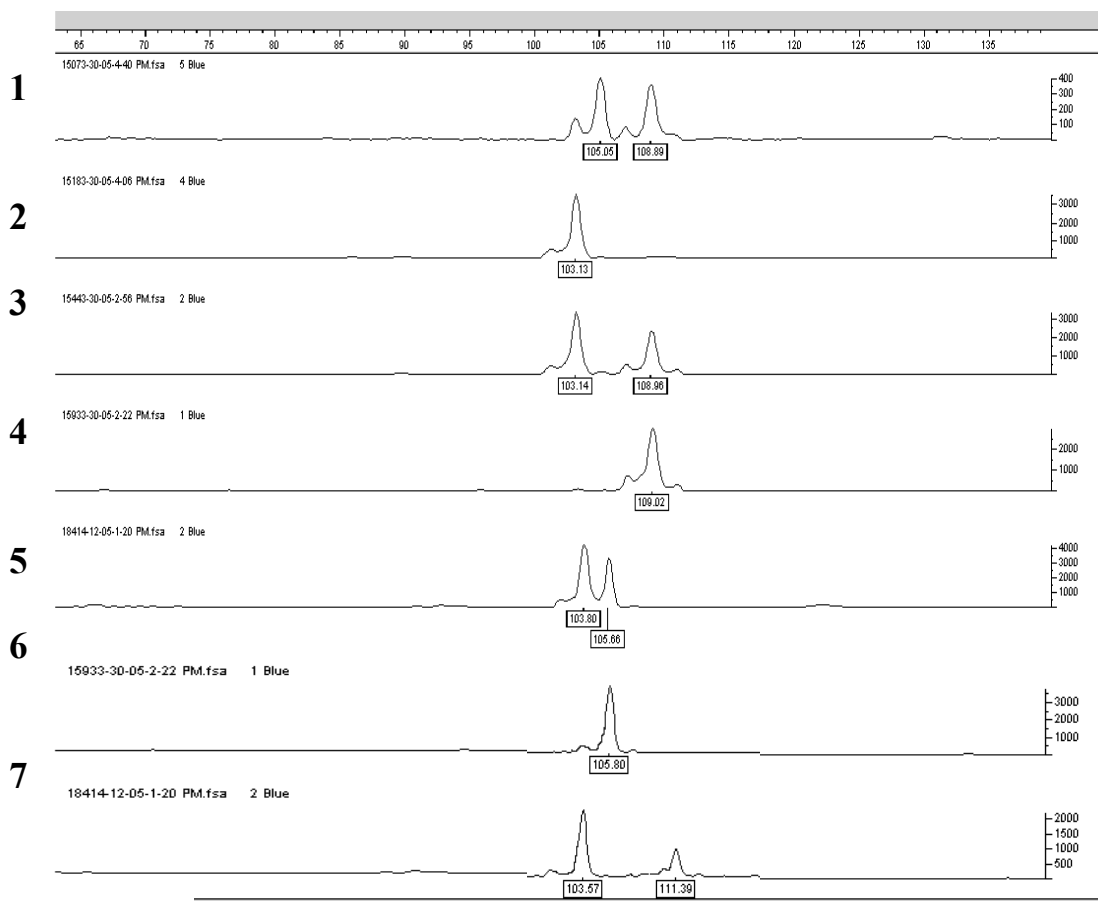
4. После окончания разделения образцов и сбора данных перенести результаты в программу анализа данных.

5. Проанализировать полученные данные.

### *Интерпретация полученных данных*

Определение аллелей проводят по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа (рис. 2). Продукт ПЦР

размером 103 п.н. амплифицируется в том случае, если в анализируемом образце присутствует аллель с 7 ТА повторов. Аллели 8, 10 и 11 имеют размер 105, 109 и 111 п.н. соответственно. Аллель 8 ассоциирован с повышенным уровнем холестерина и является фактором риска развития ПГ у лиц, являющихся носителями данного аллеля.



**Рис. 2. Варианты генотипа по полиморфизму гена рецептора ЛПНП, идентифицированные в ходе исследования: 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 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 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:

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.