

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра

Главный государственный

санитарный врач

_____ О.В. Арнаут

24 декабря 2010 г.

Регистрационный № 096-0710

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИИ *H. PYLORI***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Титов Л.П., канд. биол. наук Янович О.О.,
Носова Е.С.

Минск 2010

Назначение и область применения

Настоящая инструкция предназначена для определения резистентности бактерии *H. pylori* к препарату кларитромицину у больных хеликобактериозом методом резонансного тушения флуоресценции (FRET).

Инструкция предназначена для специалистов клинических и научно-исследовательских учреждений Республики Беларусь.

Перечень необходимого оборудования, реактивов

1. Набор для выделения ДНК из биопсийного материала.
2. Реактивы для проведения ПЦР — фермент *Taq* ДНК-полимераза (5 ед/мкл); 10×буфер для *Taq* полимеразы без MgCl₂; 10×премикс дНТФ; 25 мМ раствор MgCl₂.
3. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.
4. Одноразовая пластиковая посуда (микропробирки для ПЦР на 0,2, 0,5, 1,5 мл).
5. Отдельные наборы автоматических пипеток переменного объема (ТУ 9452-002-33189998-2002).
6. Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.
7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (с аэрозольным барьером).
8. Холодильник на 2–8 °С с морозильной камерой (ГОСТ 16317).
9. Твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл (ТУ 9452-003-46482063-01).
10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс. об/мин.
11. Вортекс-шейкер.
12. Термоциклер для проведения ПЦР (ТУ 9452-001-46482062-98).
13. Реактивы для проведения электрофореза — 6×буфер для загрузки образцов в гели (10 мМ Трис-НСl, 0,04% бромфеноловый синий, 0,04% ксилен цианол, 0,25% оранжевый Ж, 60% глицерин, 60 мМ ЭДТА); O'Range Ruler 100 пар оснований; агароза LE; бромистый этидий; 50×ТАЕ буфер для электрофореза.
14. Источник постоянного тока для электрофореза.
15. Камера для горизонтального электрофореза.
16. Ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей.
17. Термоциклер для проведения ПЦР в режиме реального времени.
18. Компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме реального времени, хранения данных и анализа.

Метод резонансного тушения флуоресценции (FRET)

Основные принципы FRET-метода

FRET-метод основан на использовании двух меченных флуоресцентной меткой проб. Первая проба помечается на 3'-конце донором, а вторая на 5'-конце FRET акцептором (например, Cy5). Первый

олигонуклеотид гибридизируется с мишенью так, что его 3'-конец отделен от 5'-конца второго олигонуклеотида не более чем на одну пару оснований. При наличии в ДНК-мишени искомого участка меченные пробы гибридизируются с мишенью и происходит перенос энергии. Флюоресценция акцептора опосредуется гасителем, который испускает флюоресценцию большей длины волны, чем акцептор. Интенсивность флюоресценции пропорциональна количеству ПЦР-продукта. FRET наблюдается только когда область длин волн флюоресцентной эмиссии донора энергии в значительной мере пересекается с областью длин волн возбуждения флюоресценции акцептора энергии. И эффективность FRET весьма значительно зависит от расстояния между хромофорными группами донора и акцептора энергии.

Данный метод позволяет одновременного определить наличие двух наиболее часто встречающихся мутаций, связанных с резистентностью *H. pylori* к кларитромицину.

Этапы проведения ПЦР в режиме реального времени

С целью определения чувствительности *H. pylori* к кларитромицину использовали FRET-метод для выявления точечной мутации в гене 23S рРНК бактерии *H. pylori*. Метод исследования точечных мутаций включает амплификацию фрагмента гена 23S рРНК *H. pylori* с одновременным определением продукта в реакции гибридизации и анализом кривых плавления с использованием ПЦР в режиме реального времени.

При каждой операции используют и меняют одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером, работают в одноразовых перчатках.

1. Выделение ДНК из биопсийного материала

ДНК из биопсийного материала выделяют стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы ДНК хранят при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. Определение наличия *H. pylori* в биопсийном материале с помощью ПЦР

Для определения наличия *H. pylori* в биопсийном материале были использованы праймеры для амплификации фрагмента длиной 267 п.о. гена 23S рРНК *H. pylori*: 5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3' (НР-прямой) и 5'-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3' (НР-обратный).

Праймеры синтезируют под заказ. Для удобства готовят раствор с концентрацией 10 пМ/мкл. Разведение праймеров готовят по формуле:

$$V = C_k * V_k / C_u,$$

где V — необходимый объем праймера;

C_k — конечная концентрация праймера (10 пМ/мкл);

V_k — конечный объем смеси (25 мкл);

C_u — исходная концентрация праймера.

Объем реакционной смеси составляет 25 мкл: 1 мкл 10 пмоль раствора прямого праймера, 1 мкл 10 пмоль раствора обратного праймера, 2 мкл 10×ПЦР-буфера, 2 мкл 25 ммоль раствора MgCl₂, 2 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл 5 ед/мкл Таq-полимеразы, 1 мкл образца ДНК (10 нг/мкл) и воды до объема 25 мкл.

В каждую пробирку добавляют одну каплю минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе амплификации. Пробирки переносят в программируемый термоциклер. Амплификацию проводят в автоматическом режиме по заданной программе: 94 °С — 5 мин, (94 °С — 20 с, 57 °С — 20 с, 72 °С — 20 с) — 28 циклов. Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм).

3. Проведение FRET реакции

При наличии *H. pylori* в биопсийном материале проводят FRET-реакцию на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Праймеры и зонды синтезируют под заказ. Для удобства готовят раствор праймеров с концентрацией 10 пМ/мкл.

Разведение зондов готовят по формуле:

$$V = C_k * V_k / C_u$$

где V — необходимый объем зонда;

C_k — конечная концентрация зонда;

V_k — конечный объем смеси (20 мкл);

C_u — исходная концентрация зонда.

В качестве праймеров используют последовательность гена 23S рНК *H. pylori*, представленную выше.

Продукт амплификации выявляют с использованием двух зондов: сенсорный зонд 5'-меченный Cy5 (зонд 1 — 5'-GGCAAGACGGAAAGACC-3'; нуклеотиды с 2504 по 2520), который гибридизируется с регионом, содержащим мутацию, и якорный зонд, присоединенный на три основания дальше и помеченный с 3'-конца флуоресцином FAM (зонд 2 — 5'-TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCC-3'; нуклеотиды с 2473 по 2501).

Готовят смесь в пробирках на 0,2 мл содержащую 1 мкл ДНК (10 нг/мкл), 1 мкл (1 пмоль) раствора прямого праймера, 1 мкл (10 пмоль) раствора обратного праймера, 1 мкл (10 пмоль) раствора зонда 1, 1 мкл (4 пмоль) раствора зонда 2, 2 мкл 10×ПЦР-буфера, 1,6 мкл (25 ммоль) раствора MgCl₂, 0,4 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл (5 ед/мкл) Таq-полимеразы, вода до объема 20 мкл. Для оценки постановки отрицательного контроля ПЦР вместо образца ДНК из биологических проб вносят 1 мкл ТЕ буфера.

Пробирки переносят в прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени и проводят амплификацию в автоматическом режиме по заданной

программе. Количество циклов амплификации и температурный режим указаны в таблице.

Таблица

Программа амплификации для определения точечных мутаций в гене 23S рРНК *H. pylori*

Шаг	Температура	Время
Денатурация	95 °С	10 мин
40 циклов	95 °С	12 с
	57 °С	20 с
	72 °С	20 с
	95 °С	15 с
Инактивирование	95 °С	15 с
плавление	от 40–90°С шаг 1°С	

4. Анализ полученных данных

Анализ полученных данных проводят по кривым плавления продуктов реакции (рис.).

При наличии дикого типа, т.е. бактерия чувствительна к препарату кларитромицин, наблюдается пик при температуре 64,5–65 °С.

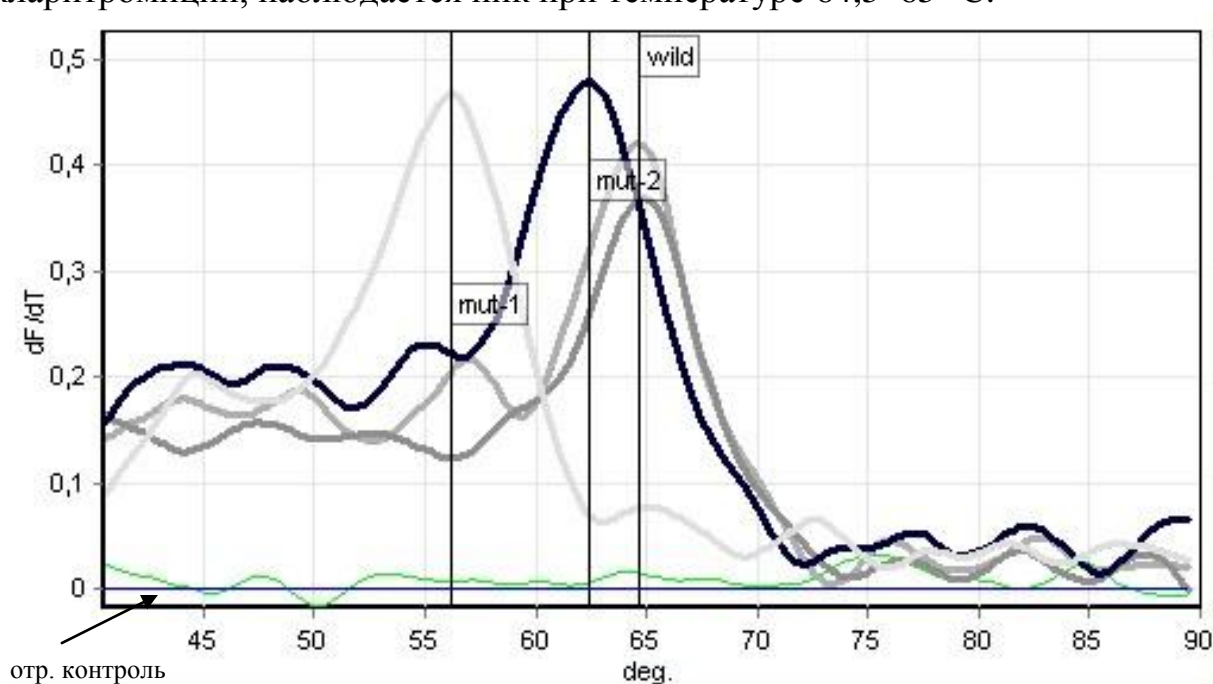


Рисунок — Анализ кривых плавления для определения наличия мутаций в гене 23S рРНК *H. pylori*

При наличии мутации в изучаемом гене температура плавления продукта снижается из-за нарушения гомологии между мишенью и гибридизационным зондом. При этом образуются пики при температуре 62,5–63 °С (A2142C) и при температуре 55,5–56 °С (A2143G).