

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
23 мая 2008 г.
Регистрационный № 096-1107

**ПРЕ- И ПОСТНАТАЛЬНАЯ ДНК-ДИАГНОСТИКА МЫШЕЧНЫХ
ДИСТРОФИЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук С.П. Фещенко, канд. мед. наук И.В. Наумчик,
канд. мед. наук Н.В. Румянцева, С.О. Мясников, Т.В. Осадчук, Р.Д. Хмель

Минск 2008

Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна–Бекера (МДДБ) — наиболее частая форма мышечной дистрофии у детей, которая наследуется по X-сцепленному рецессивному типу. Частота заболевания составляет 1 на 3500 новорожденных мальчиков (мышечная дистрофия Дюшенна) и 1 на 20000 новорожденных мальчиков (мышечная дистрофия Бекера).

Миотоническая дистрофия представляет собой одну из наиболее частых форм мышечной дистрофии у взрослых (распространенность — от 2 до 15 случаев на 100 000 человек).

Цель данной инструкции — пре- и постнатальная (витальная) ДНК-диагностика мышечной дистрофии Дюшенна–Бекера и миотонической дистрофии.

Область применения методов — медицинская генетика, неврология.

Уровень внедрения: ГУ РНПЦ «Мать и дитя», областные медико-генетические центры.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Оборудование:

- амплификатор
- генетический анализатор
- термостат для микропробирок
- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл
- пробирки объемом 1,5 мл
- пробирки объемом 50 мл
- дозаторы переменного объема
- одноразовые наконечники для дозаторов
- камера для электрофореза в полиакриламидном геле
- источник постоянного тока
- трансиллюминатор
- система для документирования гелей

2. Реагенты:

- Таq-полимераза с соответствующим буфером и раствором $MgCl_2$
- раствор дезоксирибонуклеотидов (dNTP) — dGTP, dCTP, dATP, dTTP
- диметилсульфоксид (DMSO)
- маркер молекулярного веса ROX 350
- маркер молекулярного веса LIZ 500
- бромфеноловый синий
- ксиленцианол
- глицерин
- акриламид
- N,N'-метиленабисакриламид
- Трис
- Na_2 ЭДТА

- уксусная кислота
- персульфат аммония (APS)
- тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД)
- этидиум бромид
- NH_4Cl
- KHCO_3
- NaHCO_3
- борная кислота
- этиловый спирт 96%
- додецилсульфат натрия (SDS)

3. Растворы:

Лизирующий буфер

NH_4Cl — 8,29 г KHCO_3 — 1 г Na_2EDTA — 0,04 г	или	NH_4Cl — 8,29 г NaHCO_3 — 0,84 г Na_2EDTA — 0,03 г
Довести объем раствора до 1 л дистиллированной H_2O		

3M CH_3COONa

CH_3COONa — 246 г

Довести объем раствора до 1 л дистиллированной H_2O

10 % SDS

SDS — 0,1 г

Довести объем раствора до 1 мл дистиллированной H_2O

TE-буфер (pH 8,4)

Трис — 1,21 г

Na_2EDTA — 0,372 г

Довести объем раствора до 1 л деионизированной H_2O . Стерилизовать автоклавированием

10% DMSO

DMSO — 0,1 г

Довести объем раствора до 1 мл дистиллированной H_2O

30% акриламид (29:1)

акриламид — 29 г

1% N-N-метиленабисакриламид — 1 г

Довести объем раствора до 100 мл дистиллированной H_2O

20% APS

APS — 0,2 г

Довести объем раствора до 1 мл дистиллированной H_2O

10x TBE (Трис-боратный буфер)

Трис — 54 г
Na₂EDTA — 3,72 г
Борная кислота — 27,5 г
Довести объем раствора до 0,5 л дистиллированной H₂O

50x TAE (Трис-ацетатный буфер)

Трис — 121 г
Na₂EDTA — 9,3 г
Уксусная кислота (ледяная) — 28,5 мл
Довести объем раствора до 0,5 л дистиллированной H₂O

6x погружающий раствор

Бромфеноловый синий — 0,005 г
Ксиленцианол — 0,005 г
Глицерин — 1 мл
Дистиллированная H₂O — 1 мл

9% полиакриламидный гель (ПААГ 10x15x0,1 см, конечный объем 15 мл):

30% акриламид (29:1) — 4,5 мл	30% акриламид (29:1) — 4,5 мл
10x TBE — 1,5 мл	50x TAE — 0,3 мл
Дистиллированная H ₂ O — 9 мл	Дистиллированная H ₂ O — 10,2 мл
20% APS — 60 мкл	20% APS — 60 мкл
ТЕМЭД — 20 мкл	ТЕМЭД — 20 мкл

Этидиум бромид (10 мг/мл)

Растворить 1 г этидиум бромид в 100 мл дистиллированной H₂O

Проявляющий раствор

Развести 100 мкл раствора этидиум бромид (10 мг/мл) в 1 л дистиллированной H₂O.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Наличие у пациента клинико-биохимических признаков мышечной дистрофии Дюшенна–Беккера.

1.1. Выявление крупных делеций гена дистрофина.

1.2. Установление носительства мутантной X-хромосомы в семьях с высоким риском рождения больного ребенка.

2. Наличие у пациента клинико-биохимических признаков миотонической дистрофии.

2.1. Определение количества СТG-повторов в гене миотонинпротеинкиназы

Алгоритм ДНК-диагностики мышечной дистрофии Дюшенна–Беккера и миотонической дистрофии отображен на рис. 1.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

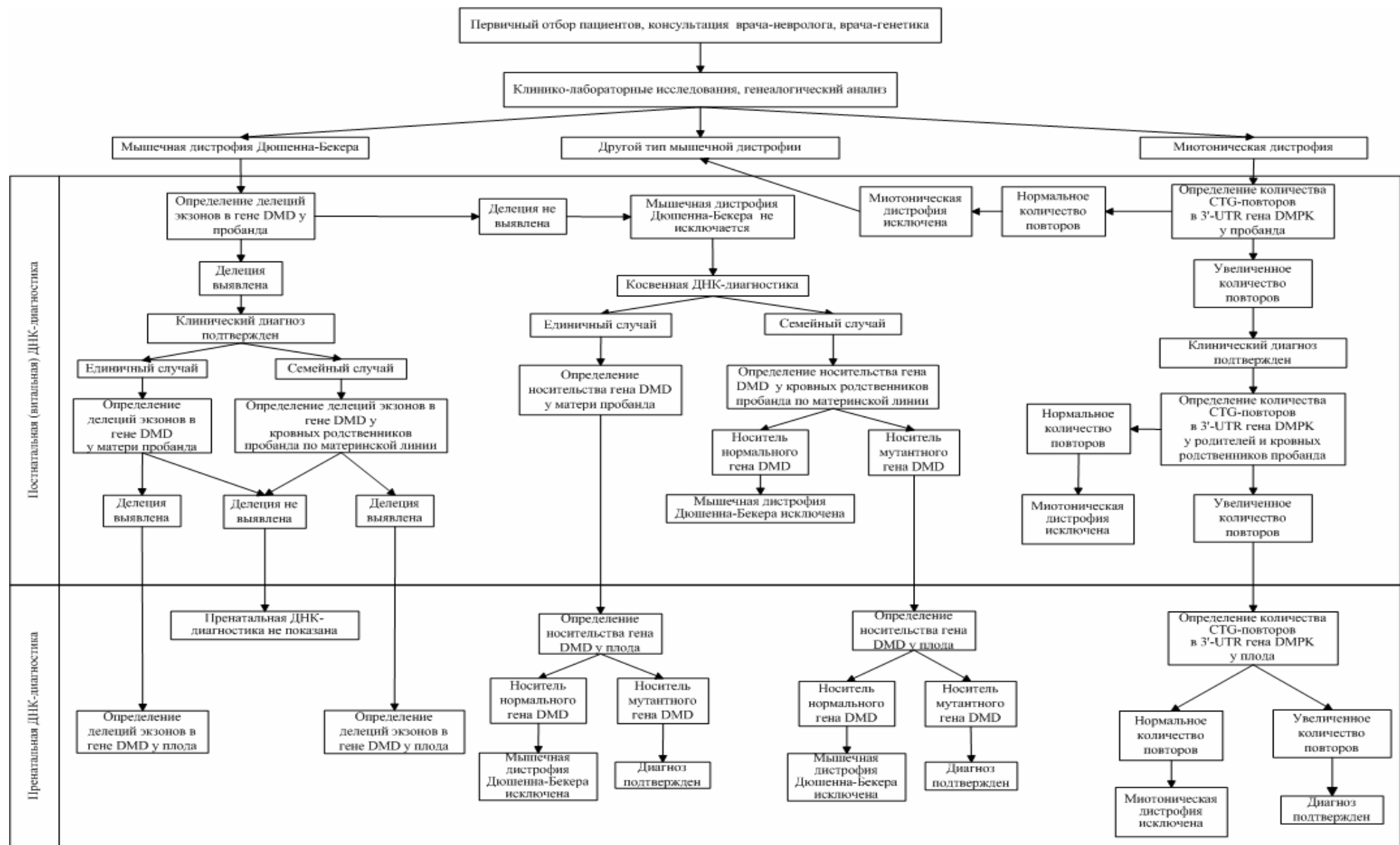


Рис. 1. Алгоритм ДНК-диагностики мышечных дистрофий

1. Методы выделения ДНК

Выделение лейкоцитов периферической крови и ДНК осуществляли согласно стандартным методам.

Выделение ДНК из амниотической жидкости

1. Амниотическую жидкость внести в центрифужные пробирки объемом 15 мл и центрифугировать 20 мин при 2000g.

2. К клеточному осадку добавить 450 мкл 0,9% раствора NaCl, 45 мкл 10% SDS и протеиназу К до конечной концентрации 1 мкг /мл.

3. Ингредиенты тщательно перемешать и инкубировать 10–12 ч при 37 °С либо 2–4 ч при 56 °С. Далее выделять ДНК стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

2. ДНК-диагностика мышечных дистрофий

ДНК-диагностика мышечной дистрофии Дюшенна–Бекера

Выявление делеций гена дистрофина

Для молекулярно-генетической диагностики МДДБ используется методика прямого определения крупных делеций гена дистрофина с помощью классической и мультиплексной ПЦР (мПЦР).

Аmplификационная смесь для мПЦР конечным объемом 50 мкл содержит 200–250 нг ДНК, 1x ПЦР буфер, 2 mM MgCl₂, 150 мкM dNTP, 3 мкл 10% DMSO, праймеры, приведенные в табл. 1, и две единицы активности Taq-полимеразы.

Аmplификация проводится при следующих условиях: первичная денатурация 94 °С, 4 мин; затем 35 циклов: денатурация: 94 °С, 30 с; отжиг 54 °С, 45 с; элонгация 65 °С, 2 мин; конечная элонгация 65 °С, 5 мин.

Аmplификационная смесь для классической ПЦР конечным объемом 20 мкл содержит 100 нг ДНК, 1x ПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 200 мкM dNTP, праймеры, приведенные в табл. 2, и 0,5 единицы активности Taq-полимеразы.

Аmplификация проводится при следующих условиях: первичная денатурация 94 °С, 4 минуты; затем 30 циклов: денатурация 94 °С, 30 с; отжиг 54 °С, 30 с; элонгация 65 °С, 1 мин; конечная элонгация 65 °С, 5 мин.

Обязательным условием при выявлении делеций является использование положительного контрольного образца, в качестве которого можно применять ДНК матери пробанда или клинически здорового донора мужского пола. Отсутствие продукта амплификации экзона у пациента и присутствие его в контрольном образце свидетельствует о делеции экзона. Во избежание ложноположительных результатов следует провести повторную амплификацию отсутствующего при мПЦР экзона методом классической ПЦР.

Праймеры, использованные для мПЦР

Экзон	Количество каждого праймера, пмоль	Размер продукта (п.о.)	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'
1-я смесь праймеров				
4	5	196	ttgtcgggtctcctgctggctcagtg	caaagccctcactcaaacatgaagc
13	8	238	aataggagtacctgagatgtagcagaaat	ctgaccttaagttgttcttccaagcag
8	7	360	ggcctcattctcatgttctaattag	gtcctttacacactttacctgttgag
3	7	410	tcatccatcatcttcggcagattaa	caggcggtagagtatgccaaatgaaaatca
19	5	459	gatggcaaaaagtgttgagaaaaagtc	ttctaccacatcccattttcttcca
1	8	535	gaagatctagacagtggatacataacaatgcatg	ttctccgaaggtaattgcctccagatctgagtc
2-я смесь праймеров				
42	5	155	cacactgtccgtgaagaaacgatgatg	ttagcacagaggcaggagcattgag
47	7	181	cgttggtgcattgtctgtttcagttac	gtctaacctttatccactggagattg
6	5	202	ccacatgtaggtcaaaaatgtaatgaa	gtctcagtaatcttcttacctatgactatgg
45	7	307	cttgatccatgatgtttacctgca	tccatcacccttcagaacctgatct
43	7	375	gaacatgtcaaagtcactggacttcatgg	atatatgtgttacctaccctgtcgggtcc
3-я смесь праймеров				
52	5	113	aatgcaggatttggaaacagaggcgtcc	ttcgatccgtaatgattgttctagcctc
60	5	139	aggagaaaattgcgcctctgaaagagaacg	ctgcagaagcttccatctgggtgttcagg
53	7	212	ttgaaagaattcagaatcagtgggatg	cttggtttctgtgattttcttttgattg
50	5	271	caccaaatggattaagatgttcatgaat	tctcttcaccagtcactcactcatag
51	7	388	gaaattggctcttagcttgtgtttc	ggagagtaaagtgattggtgaaaatc
49	5	439	gtgcccttatgtaccaggcagaaattg	gcaatgactcgtaatagccttaagatc

Праймеры, использованные для классической ПЦР

Экзон	Количество каждого праймера, пмоль	Размер продукта (п.о.)	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'
12	5	331	gatagtgggctttacttacatccttc	gaaagcacgcaacataagatacacct
16	5	290	tctatgcaaatgagcaatacacgc	ggatcactaacctgtgctgtactc
17	5	416	gacttctgatgtgagattactttccc	aagcttgagatgctctcacctttcc
32	5	253	gaccagtattgtttgaaaggcaaa	ttgccaccagaaatacataccacacaatg
34	5	171	gtaacagaaagaaagcaacagttggagaa	ctttccccaggcaacttcagaatccaaa
41	8	274	gtagtaactgcctgggccctgtattg	tagagtagtagttgcaaacacatacgtgg
48	8	506	ttgaatacattggttaatcccaacatg	cctgaataaagtcttccttaccacac

Косвенная ДНК-диагностика методом анализа STR-маркеров

Для анализа STR-маркеров используется метод классической ПЦР с последующим разделением продуктов амплификации с помощью капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе.

Реакционная смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 100 нг ДНК, 1х ПЦР буфер, 2 mM MgCl₂, 100 мкМ dNTP, по 5 пмоль каждого праймера и 0,5 единицы активности Taq-полимеразы.

Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании на генетическом анализаторе используются прямые праймеры, имеющие метку 6-FAM на 5'-конце. Последовательность праймеров и условия амплификации приведены в табл. 3.

Таблица 3

Последовательность праймеров и условия амплификации для STR-маркеров

Название праймера	Последовательность 5'-3'	Условия амплификации			
		Стадия ПЦР	Температура, °С	Время	Количество циклов
STR-44-F	6-FAM-tccaacattggaatcacatttcaa	начальная денатурация	95	5 мин	30
STR-44-R	tcatcacaaatagatgtttcacag	денатурация	95	30с	
STR-45-F	6-FAM-gaggctataattctttaactttggc	денатурация	63	30 с	
STR-45-R	ctctttccctctttattcatgttac	отжиг элонгация конечная элонгация	72 72	25 с 3 мин	
STR-49-F	6-FAM-cgtttaccagctcaaaatctcaac	начальная денатурация	95	5 мин	30
STR-49-R	catatgatacgattcgtgttttgc	денатурация	95	30 с	
		отжиг	64	30 с	
		элонгация конечная элонгация	72 72	25 с 3 мин	
DI671-F	6-FAM-tcgccccttcagaagtcaact	начальная денатурация	95	5 мин	25
DI671-R	gtccagcagatcaatcgtccagc	денатурация	95	30 с	
		отжиг	60	30 с	
		элонгация конечная элонгация	72 72	30 с 3 мин	
DYS-II-F	6-FAM-tcttgatatagggattattgtgtttgtatac	начальная денатурация	95	5 мин	30
DYS-II-R	attatgaaactataaggaataactcatttagc	денатурация	95	30 с	
		отжиг	60	30 с	
		элонгация конечная элонгация	72 72	1 мин 3 мин	

ДНК-диагностика миотонической дистрофии

Для молекулярно-генетической диагностики миотонической дистрофии используется методика прямого определения количества СТG повторов в гене миотонинпротеинкиназы с помощью классической ПЦР с последующим разделением продуктов амплификации посредством капиллярного гель-электрофореза.

Амплификационная смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 100 нг ДНК, 1x ПЦР буфер, 1,5 mM MgCl₂, 2 мкл 10% диметилсульфоксида, 200 мкМ dNTP, по 5 пмоль праймеров и 0,75 единиц активности Taq-полимеразы.

Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании в автоматическом анализаторе используется меченый прямой праймер с молекулой-«репортером» 6-FAM на 5'-конце.

Последовательность праймеров:

1. DM101 5'- 6-FAM- CTCCCAGGCCTGCAGTTTGCCCATC-3'
2. DM102 5'- GAACGGGGCTCGAAGGGTCTTGTAGC-3'

После денатурации образцов при 95 °С в течение 5 мин выполняется 30 циклов амплификации при следующих условиях: 1 мин денатурации при 95 °С, 1 мин отжига при 65 °С и 1 мин синтеза при 72 °С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72 °С.

3. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР

Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле

Для разделения продуктов мПЦР необходимо использовать 9% ПААГ (29:1) длиной не менее 10 см. Электрофоретическое разделение следует проводить в течение 1,5–2 часов при 260 В.

После проведения электрофореза поместить гель на 10–15 мин в проявляющий раствор. Визировать результаты электрофоретического разделения в проходящем ультрафиолетовом свете. Для документального фиксирования результатов можно использовать камеру для фотографирования гелей.

Электрофоретический анализ в генетическом анализаторе

0,7 мкл амплификата смешать с 0,7 мкл маркера молекулярного веса и 8,5 мкл деионизированного формамида. Смесь денатурировать 2,5 мин при 95 °С. Электрофорез проводится при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр — 5 с, время разделения — 24 мин, напряжение — 7,5 кВ, длина детектора — 36 см. Обработка данных выполняется с помощью стандартного пакета компьютерных программ для генетического анализатора.

Ошибки при выполнении могут быть связаны с загрязнением образцов ДНК и реактивов, деградацией образцов ДНК и реактивов вследствие нарушения условий хранения, а также несоблюдением правил проведения рекомендуемых методик.

4. Примеры ДНК-диагностики мышечной дистрофии Дюшенна–Бекера и миотонической дистрофии
Выявление делеций гена дистрофина

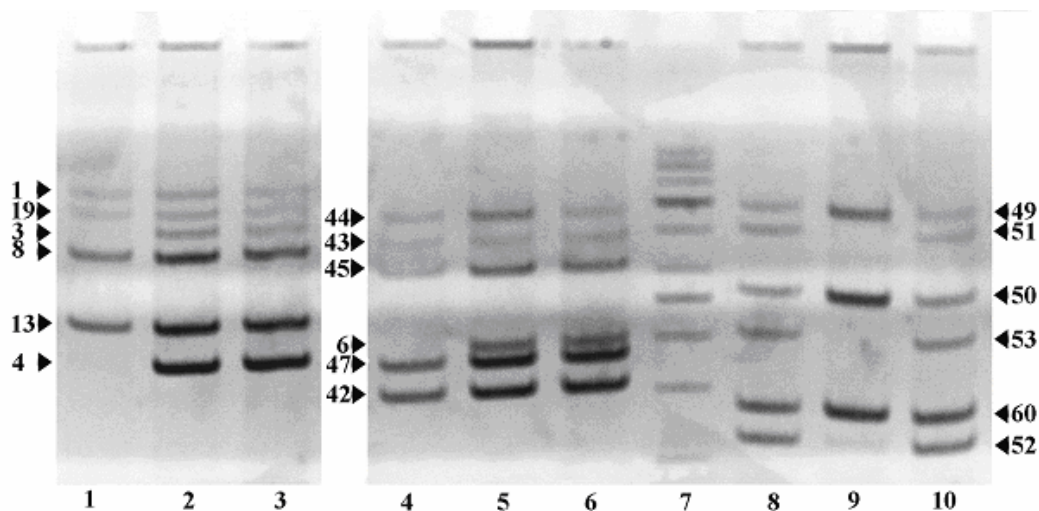


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов мПЦР. Дорожки 1, 4, 8 — пациент № 1; дорожки 2, 5, 9 — пациент № 2, дорожки 3, 6, 10 — контрольный образец, 7 — маркер молекулярного веса. Цифрами указаны номера амплифицированных экзонов гена дистрофина

Интерпретация результатов: у пациента № 1 — делеция 3, 4 и 6-го экзонов, у пациента № 2 — делеция 51, 52 и 53-го экзонов гена дистрофина, что подтверждает клинический диагноз МДД.

Анализ STR-маркеров

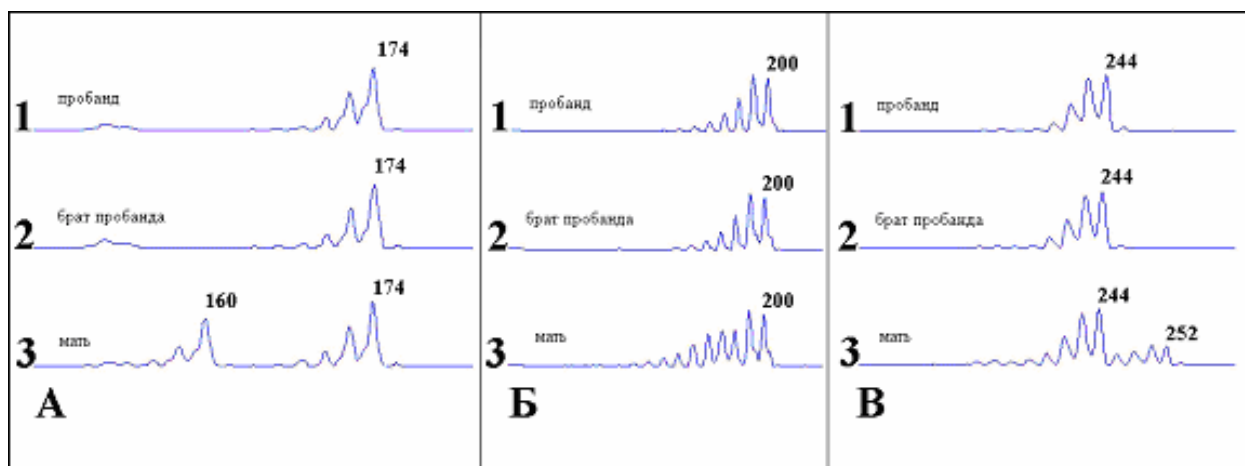


Рис. 3. Результаты автоматического флуоресцентного анализа продуктов амплификации STR-маркеров дистрофина. А — маркер STR-44; Б — маркер STR-45; В — маркер STR-49. Дорожка № 1 — пробанд, дорожка № 2 — брат пробанда, дорожка № 3 — мать пробанда

Интерпретация результатов: для данной семьи информативными являются маркеры STR-44 и STR-49, так как мать является гетерозиготой по этим маркерам (аллели 160/174 для STR-44 и аллели 244/252 для STR-49).

Определение количества CTG-повторов в гене миотонинпротеинкиназы

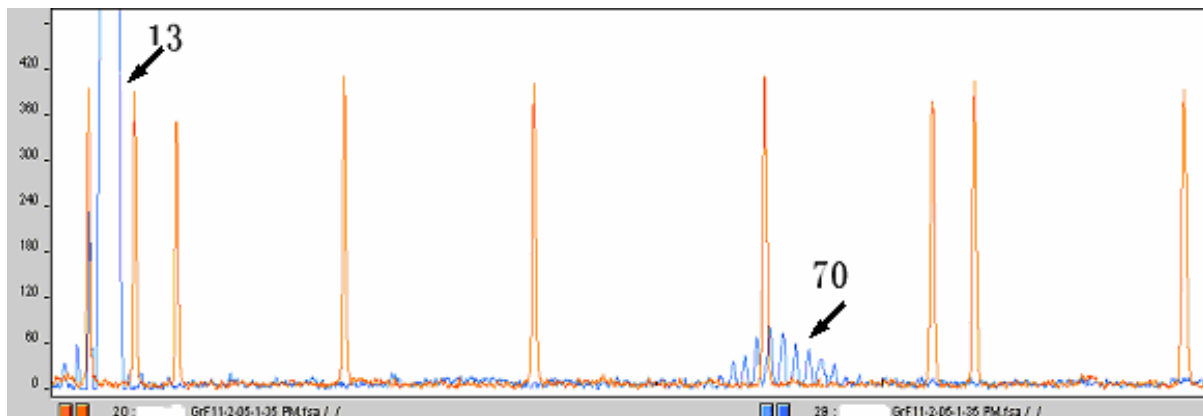


Рис. 4. Результаты автоматического флуоресцентного анализа продуктов амплификации аллелей с экспансией CTG-повторов. Вариант генотипа 13/70 (аллели указаны стрелками)

Интерпретация результатов: наличие аллеля 70 подтверждает клинический диагноз «миотоническая дистрофия».