

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
6 марта 2008 г.
Регистрационный № 138-1105

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ ТРОМБОФИЛИЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук Н.Б. Гусина, канд. мед. наук И.В. Наумчик,
А.А. Гусина

Минск 2008

Тромбозы артериальных и венозных сосудов ассоциированы с различными дефектами тромбоцитарного звена гемостаза и белков свертывающей и противосвертывающей систем. Примерно половину этих дефектов составляют наследственно обусловленные формы, так называемые первичные тромбофилии, которые играют важнейшую роль в развитии тромбозов различной локализации.

Наиболее частыми причинами наследственных тромбофилий являются дефекты генов прокоагулянтных белков и ферментов метаболизма гомоцистеина: лейденская мутация (мутация G1691A в гене фактора V), мутация в гене протромбина G20210A, мутация C677T в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР). Риск тромбообразования у носителей лейденской мутации, мутации G20210A в гене протромбина повышен в 6-7 раз по сравнению с носителями.

Область применения: данная инструкция разработана с целью раннего выявления наследственной тромбофилии, что позволит выбрать оптимальную тактику ведения пациентов, проведения адекватной первичной и вторичной профилактики в группах повышенного риска тромбообразования.

Отбор пациентов в группы повышенного риска в соответствии с предлагаемым алгоритмом будет проводиться врачами различных специальностей: хирургами, терапевтами, акушерами-гинекологами.

Уровень внедрения: проведение ДНК-диагностики в лабораториях молекулярно-генетических исследований (РНПЦ «Мать и дитя», РНПЦ ДОГ, НИИ онкологии и радиологии).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Программируемый нагревательный блок (амплификатор), пробирки Eppendorf — 1,5 мл.

Пробирки для ПЦР — 0,5 мл.

Камеры для горизонтального и вертикального электрофореза.

Стекла соответствующего размера.

Прокладки и гребенки соответствующей толщины.

Источник постоянного тока.

UV трансиллюминатор.

Камера для фотографирования гелей.

Фотобумага.

Микропланшетный ридер (Multiscan MMC/340).

Микропипетки с одноразовыми наконечниками.

Taq-полимераза 5 U/μl.

Готовые наборы реагентов для определения мутации Лейден, мутаций G20210A гена протромбина и C677T гена метилентетрагидрофолатредуктазы.

Бромфеноловый синий.

Ксиленцианол.

Сахароза.
Агароза.
Акриламид.
N,N'-метиленбисакриламид.
Персульфат аммония.
TEMED.
Трис.
ЭДТА
Борная кислота.
Бромистый этидий.
Маркер молекулярного веса.
H₂O.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Больные с венозными тромбозами различной локализации независимо от возраста и обстоятельств возникновения тромбоза с целью установления причины развития заболевания.

2. Здоровые лица, имеющие родственников, больных венозным тромбозом, с целью оценки риска возникновения венозного тромбоза.

3. Лица с неотягощенным личным и семейным тромботическим анамнезом, планирующие оперативное вмешательство, беременность, прием лекарственных препаратов, увеличивающих вероятность тромбообразования, с целью оценки риска возникновения тромбоэмболических осложнений в послеоперационном периоде, во время беременности и после родов, в ходе приема лекарственных препаратов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Нет.

Алгоритм лабораторной диагностики наследственных форм тромбофилии



Приготовление растворов:

- 30% раствор полиакриламида: 29 г акриламида, 1 г N,N'-метиленбисакриламида, дистиллированная вода до 100 мл.
- 10^X TBE буфер: 3,72 г ЭДТА, 27,5 г борной кислоты, 54 г триса, дистиллированная вода до 500 мл.
- 20% персульфат аммония: 0,2 г персульфата аммония, дистиллированная вода до 1 мл.
- 6^X буфер для нанесения проб: 0,25% раствор бромфенолового синего, 0,25% раствор ксилолцианола, 40% раствор сахарозы. Хранить при t=4 °C.
- раствор бромистого этидия 10 мг/мл: 1 г бромистого этидия, 100 мл дистиллированной воды. Размешивать на магнитной мешалке в течение нескольких часов, хранить в темноте в плотно закупоренном сосуде.

Материал для исследования

Венозная кровь, образцы капиллярной крови, высушенные на бумажных бланках, используемых для иммунофлуоресцентного или ДНК-анализа.

Правила забора крови для исследования

Для идентификации мутаций необходима венозная кровь в количестве 5 мл, взятая в пробирку с раствором ЭДТА. После забора крови пробирку необходимо плотно закрыть крышкой и несколько раз повернуть (не встряхивать!) вверх-вниз для лучшего перемешивания крови с реактивом ЭДТА. На пробирке необходимо указать фамилию и инициалы больного, дату забора материала. До момента транспортировки в лабораторию материал должен храниться в холодильнике, но не более 3 дней.

Данный материал может быть использован также для количественного определения гомоцистеина в плазме. В этом случае кровь необходимо забирать натощак. Непосредственно сразу или в течение 1 ч после забора плазма должна быть отделена от эритроцитов центрифугированием и перенесена в другую пробирку. Кровь до центрифугирования должна храниться при температуре менее +8 °C. Образцы плазмы для определения уровня гомоцистеина до момента транспортировки в лабораторию могут храниться в холодильнике в течение недели.

Идентификация мутаций может быть проведена в образцах крови, высушенных на специальной бумаге. Забор крови осуществляется в соответствии с инструкцией, указанной на бланке.

Методика молекулярно-генетической диагностики наследственной тромбофилии

Молекулярная диагностика тромбофилии проводится с использованием полимеразной цепной реакции.

Подготовка пробы состоит в выделении лейкоцитов из цельной крови, из которых затем методом фенольно-хлороформной экстракции выделяют ДНК.

Выделение лейкоцитов

1. К 5 мл крови добавить 40 мл лизирующего буфера, тщательно перемешать и оставить на 20 мин на ледяной бане.
2. Центрифугировать при 2000 об./мин в течение 5 мин.
3. Удалить супернатант, добавить 5 мл холодного лизирующего буфера и оставить на 10 мин на ледяной бане.
4. Добавить 45 мл физиологического раствора, тщательно перемешать.
5. Центрифугировать при 2000 об./мин в течение 5 мин.
6. Удалить супернатант, добавить 1,5 мл физиологического раствора и тщательно перемешать.
7. Центрифугировать при 4000 об./мин в течение 10 мин.
8. Удалить супернатант, лейкоциты использовать для выделения ДНК.

Выделение ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции

1. К выделенным стандартным методом лейкоцитам добавить 0,1 объема 10% SDS (додецилсульфат натрия) и протеиназу К до конечной концентрации 1 мг/мл.
2. Ингредиенты тщательно перемешать и инкубировать в течение 14–16 ч при 37 °С.
3. К полученной смеси добавить 0,5 объема фенола и 0,5 объема смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в пропорции 24:1. Компоненты медленно перемешать переворачиванием пробирок в течение 2-х мин.
4. Центрифугировать 6 мин при 6000 об./мин.
5. Верхнюю фазу собрать в пробирки, добавить 0,5 объема фенола и 0,5 объема смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в пропорции 24:1.
6. Центрифугировать 6 мин при 6000 об./мин.
7. Верхнюю фазу собрать в чистые пробирки, добавить 0,1 объема ацетата натрия (рН = 5,2) и 3 объема 96% этанола.
8. Видимый высокомолекулярный сгусток ДНК перенести в другую пробирку, промыть в 500 мкл 70% этанола, этанол слить.
9. ДНК высушить и растворить в 200 мкл дистиллированной воды.

1. Протокол определения лейденской мутации методом ПЦР-амплификации-рестрикции с последующим электрофоретическим разделением рестрикционных фрагментов

Полимеразная цепная реакция

Составить общую реакционную смесь в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Состав общей реакционной смеси на 10 проб объемом 25 мкл каждая, предназначенной для анализа образцов ДНК на наличие Лейденской мутации

Компонент	Объем, мкл (на 10 проб)
Master mix*	225
Вода	4

<i>Taq</i> -полимераза (5 ед/мкл)	1
Общий объем	230

*Смесь реактивов «Master mix» включает смесь всех ионов и кофакторов (в т. ч. и два олигонуклеотидных праймера).

Все компоненты смешать на ледяной бане в указанной последовательности в конической пластиковой пробирке объемом 1,5 мл, после чего в промаркированные пробирки для проведения ПЦР объемом 0,5 мл перенести по 23 мкл смеси. В первые 7 пробирок добавить по 2 мкл анализируемой ДНК (50–100 нг/пробу), в 8 и 9-ю пробирки — по 2 мкл контрольных ДНК, содержащих и не содержащих мутации, в десятую — 2 мкл воды. Сверху на пробы наслоить по 25 мкл минерального масла.

Провести 38 циклов ПЦР в следующем режиме:

Название этапа	Температура, °С	Время, сек
Денатурация ДНК	94	5
Отжиг праймеров	57	5
Полимеризация	72	5

Для получения более стабильных результатов в первом цикле ПЦР увеличить до 2 мин время денатурации ДНК при 94 °С, а в последнем цикле — время элонгации праймера при 72 °С. По окончании ПЦР пробирки с образцами поместить на ледяную баню.

Рестрикция

На ледяной бане к 20 мкл буфера для рестриктазы *Mnl* I (x10) добавить 10 единиц рестриктазы *Mnl* I и по 2 мкл смеси внести под масло в каждую пробирку с продуктами ПЦР, исключая пробирку, в которую вместо ДНК вносилась вода. Пробирки центрифугировать 30 с и поместить в термостат при 37 °С на 1,5–2 ч.

Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов

Разделение рестрикционных фрагментов проводят с помощью электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле. Для приготовления 22 мл 7,5% полиакриламидного геля смешать в указанной последовательности 5,5 мл 30% раствора полиакриламида, 2,2 мл 10^X ТВЕ буфера, 75 мкл 20% раствора аммония персульфата, 14,3 мл дистиллированной воды, 22 мкл TEMED. Раствор тщательно перемешать, залить между подготовленными для заливки геля стеклами, вставить гребенку и оставить для полимеризации на 30–40 мин. После полимеризации геля гребенку удалить, лунки промыть дистиллированной водой. Стекла поместить в электрофоретическую камеру, заполненную 1^X ТВЕ буфером, лунки геля промыть 1^X ТВЕ буфером. В лунки геля нанести по 20–23 мкл анализируемого образца, предварительно смешанного с 1X буфером для нанесения проб в соотношении 1:10. В крайнюю лунку нанести маркер молекулярного веса. Камеру подключить к источнику постоянного тока. Электрофоретическое разделение проводить в течение 40–60 мин при напряжении 280В. По окончании электрофореза камеру разобрать, извлечь пластинку геля и поместить в раствор бромистого

этидия на 5–10 мин. Для окраски ДНК 100 мкл исходного раствора бромистого этидия с концентрацией 10 мг/мл растворить в 500 мл 1^X TBE буфера. Результаты оценивают визуально при просмотре окрашенных этидий-бромидом гелей в ультрафиолетовом свете (рис. 1).

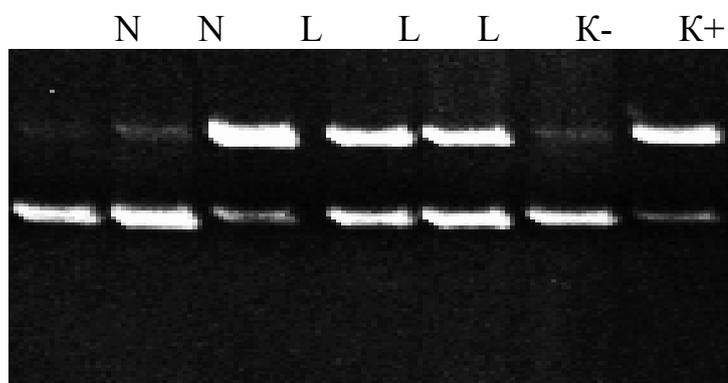


Рис. 1. Идентификация лейденской мутации методом ПЦР-амплификации-рестрикции с последующим электрофоретическим разделением рестрикционных фрагментов K⁺ положительный контроль; K⁻ отрицательный контроль; N — норма; L — гетерозиготный вариант мутации Лейден

2. Протокол определения мутации G20210A гена протромбина методом ПЦР-амплификации-рестрикции с последующим электрофоретическим разделением рестрикционных фрагментов

Полимеразная цепная реакция

Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР, как указано выше.

Провести 42 цикла ПЦР в следующем режиме:

Название этапа	Температура, °С	Время, с
Денатурация ДНК	94	5
Отжиг праймеров	50	5
Полимеризация	72	5

Для получения более стабильных результатов в первом цикле ПЦР увеличить до 2 мин время денатурации ДНК при 94 °С, а в последнем цикле — время элонгации праймера при 72 °С. По окончании ПЦР пробирки с образцами поместить на ледяную баню.

Рестрикция

В отдельные маркированные пробирки объемом 0,5 мл отобрать из-под масла по 10 мкл реакционной смеси с полученным ПЦР-продуктом, которые в дальнейшем при необходимости можно использовать для повторной рестрикции. На ледяной бане к 10 мкл буфера для рестриктазы *Taq* I (x10) добавить 10 единиц рестриктазы *Taq* I (1 мкл) и по 1 мкл смеси внести под масло в каждую пробирку с продуктами ПЦР, исключая пробирку, в которую вместо ДНК вносилась вода. Пробирки центрифугировать 30 с и поместить в термостат при 72 °С на 2 ч.

Электрофоретическое разделение рестриционных фрагментов

Разделение рестриционных фрагментов проводят с помощью электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле. Результаты оценивают визуально при просмотре окрашенных этидий-бромидом гелей в ультрафиолетовом свете.

3. Протокол определения мутации гена метилентетрагидрофолатредуктазы С677Т методом ПЦР-амплификации-рестрикции с последующим электрофоретическим разделением рестриционных фрагментов

Полимеразная цепная реакция

Провести 38 циклов ПЦР в следующем режиме:

Название этапа	Температура, °С	Время, с
Денатурация ДНК	94	5
Отжиг праймеров	59	5
Полимеризация	72	5

Для получения более стабильных результатов в первом цикле ПЦР увеличить до 2 мин время денатурации ДНК при 94 °С, а в последнем цикле — время элонгации праймера при 72 °С. По окончании ПЦР пробирки с образцами поместить на ледяную баню.

Рестрикция

На ледяной бане к 20 мкл буфера для рестриктазы *Hinf* I (x10) добавить 10 единиц рестриктазы *Hinf* I и по 2 мкл смеси внести под масло в каждую пробирку с продуктами ПЦР, исключая пробирку, в которую вместо ДНК вносилась вода. Пробирки центрифугировать 30 с и поместить в термостат при 37 °С на 1,5 ч.

Электрофоретическое разделение рестриционных фрагментов (рис. 2)

Разделение рестриционных фрагментов проводят с помощью электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле. Результаты оценивают визуально при просмотре окрашенных этидий-бромидом гелей в ультрафиолетовом свете.

ТТ СТ ТТ СТ N СТ N К⁺ К⁻

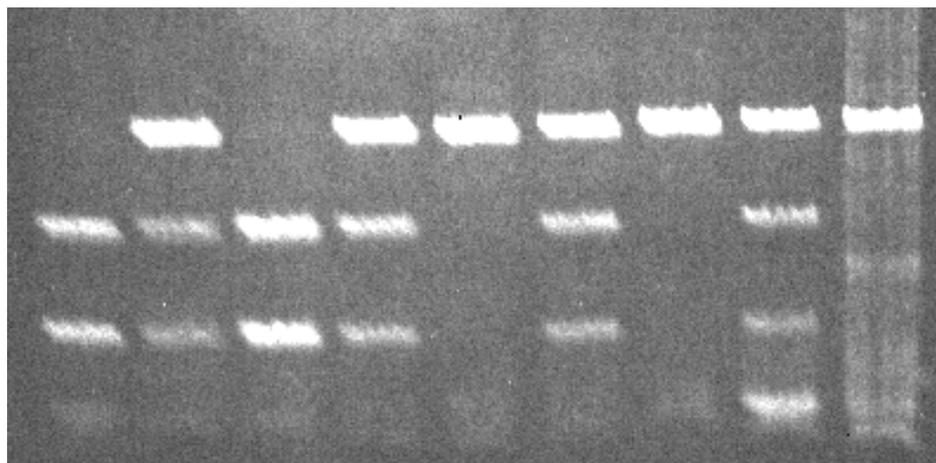


Рис. 2. Идентификация мутации гена МТГФР С677Т методом ПЦР-амплификации-рестрикции с последующим электрофоретическим разделением рестрикционных фрагментов К⁻ — отрицательный контроль; К⁺ — положительный контроль (гетерозиготный вариант мутации С677Т); N — норма; СТ — гетерозиготный вариант мутации С677Т; ТТ — гомозиготный вариант мутации

4. Протокол идентификации лейденской мутации V, мутаций G20210A гена протромбина и С677Т гена МТГФР методом мультиплексной амплификации и гибридизации с олигоспецифичными нуклеотидами.

Полимеразная цепная реакция

В промаркированные пробирки для проведения ПЦР внести по 1 мкл анализируемой ДНК (концентрация ДНК в образце около 150 нг/мкл). Затем составить общую реакционную смесь в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Состав общей реакционной смеси, предназначенной для идентификации лейденской мутации V, мутаций G20210A гена протромбина и С677Т гена МТГФР

Компонент	Объем, мкл на одну пробу
Amplification mix ThromboRisk	19,0
Taq-полимераза (5 ед./мкл)	0,4
Общий объем	19,4

Все компоненты смешать в указанной последовательности в конической пластиковой пробирке на 0,5 мл. Taq-полимеразу добавить непосредственно перед переносом смеси в пробирки для проведения амплификации и тщательно перемешать с помощью пипетки. Далее в промаркированные пробирки для проведения ПЦР перенести по 19,4 мкл смеси. Сверху на пробы наслоить по одной капле минерального масла.

Протокол амплификации:

1. 94 °С	5 мин	}	15 циклов
2. 94 °С	30 с		
3. 66 °С	20 с		
4. 72 °С	20 с		
5. 72 °С	2 мин	}	25 циклов
6. 94 °С	30 с		
7. 58 °С	30 с		
8. 72 °С	30 с		
9. 72 °С	5 мин		

Постамплификационная обработка

5 мкл амплификата перенести в другую пробирку и использовать для контроля амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для проведения электрофореза следует использовать 1,8% агарозный гель. Для приготовления геля к 1,8 г агарозы добавить 1ХТВЕ до общего объёма 100 мл. Взвесить нагреть на водяной бане или в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Раствор остудить до 50 °С и добавить исходный раствор бромистого этидия (10 мг/мл) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Раствор налить в форму, немедленно вставить гребенку и оставить для затвердения при комнатной температуре на 30–40 мин. После затвердения геля гребенку извлечь, поместить гель в электрофорезную кювету и добавить необходимое количество электрофорезного буфера. В лунки геля нанести по 5 мкл исследуемого образца, предварительно смешанного с буфером для нанесения пробы в пропорции 1:5. В крайнюю лунку нанести маркер молекулярного веса. Камеру подключить к источнику постоянного тока. Электрофоретическое разделение проводить в течение 10–20 мин при напряжении 100–120В. По окончании электрофореза извлечь пластинку геля и поместить ее на стекло UV трансиллюминатора. Результаты оценивают визуально (табл. 3).

Таблица 3

Длина амплифицируемых фрагментов генов фактора V (FV), протромбина (Pt), метилентетрагидрофолатредуктазы

Ген	Мутация	Длина амплифицируемого фрагмента
FV	1691 G>A	220 bp
Pt	20210 G>A	420 bp
MTGF	677 C>T	200 bp

Для постамплификационной обработки следует использовать оставшиеся 15 мкл амплификата.

Составить реакционную смесь для постамплификационной обработки в соответствии с табл. 4.

Состав реакционной смеси для пост-амплификационной обработки
ПЦР-продукта

Компонент	Объем, мкл на одну пробу
Pronto Buffer 2	60,0
Soluton C	3,0
Soluton D	2,0
Общий объем	65,0

Все компоненты смешать в указанной последовательности и перемешать с помощью пипетки 5 раз.

В каждую пробирку, содержащую 15 мкл амплификата, перенести по 65 мкл смеси для постаплификационной обработки и тщательно перемешать с помощью пипетки. В каждую пробирку добавить по одной капле минерального масла. Инкубировать в амплификаторе 30 мин при температуре 37 °С, затем 10 мин при температуре 95 °С. После проведения постаплификационной обработки образец можно хранить при температуре 2–8 °С не более 4-х ч.

Гибридизация с аллель-специфичными олигонуклеотидами

1. Программирование амплификатора.

Цикл	Температура	Время
Старт	94 °С	15 с
20 циклов	94 °С	30 с
	52 °С	10 с
Конец	18–25 °С — охладить до комнатной температуры	

2. Промаркировать пластину для проведения гибридизации.

3. По 8 мкл амплификата, прошедшего постаплификационную обработку, перенести в ячейки пластины для проведения гибридизации.

4. В каждую ячейку добавить по одной капле минерального масла.

5. Запустить программу амплификатора. Пластины для гибридизации поместить в амплификатор, когда температура достигнет 90 °С.

6. По окончании гибридизации продукты реакции могут быть использованы для проведения иммуноферментного анализа в течение 24 ч.

Проведение детекции методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Все реактивы, используемые на данном этапе, должны быть комнатной температуры.

1. Промаркировать пластину для проведения детекции.

2. В каждую ячейку пластины для гибридизации добавить по 100 мкл специального буферного раствора и перемешать его с содержимым ячейки так, чтобы раствор приобрел зеленую окраску.

3. 100 мкл раствора из ячейки пластины для гибридизации перенести в соответствующую ячейку пластины для детекции.

Далее проводить ИФА по стандартной методике.

Визуальная оценка результатов

Для каждой мутации на микропланшете имеются два параллельных ряда ячеек. На один ряд нанесены пробы для нормальной последовательности, на другой — для мутантной. Если гибридизация с пробой прошла, появляется окраска. В случае двух мутантных аллелей (гомозиготный носитель) окраска будет только там, где нанесена проба на мутацию. Если пациент имеет только один мутантный аллель (гетерозиготный носитель), то окраска появится в обоих рядах (рис. 3).

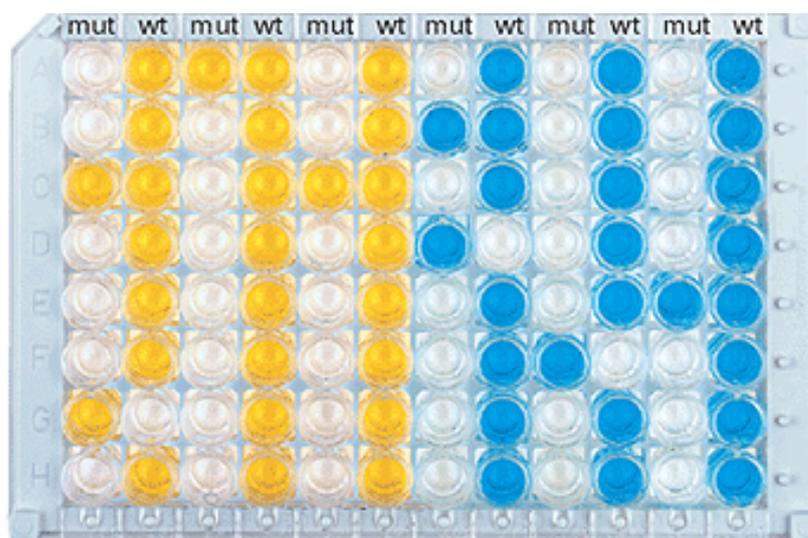


Рис. 3. Визуальная идентификация мутации методом гибридизации с аллель-специфичными олигонуклеотидами

В случае необходимости документирования результатов исследования следует измерить оптическую плотность образцов с помощью микропланшетного ридера (Multiscan MMC/340) при длине волны 620 нм. Рекомендуемые значения оптических плотностей представлены в табл. 5.

Таблица 5

Рекомендуемые значения оптических плотностей при колориметрической идентификации мутаций

Генотип	Значение оптической плотности в ячейке мутантной последовательности (mut)	Значение оптической плотности в ячейке нормальной последовательности (wt)	Соотношение оптических плотностей ячеек мутантной и нормальной последовательностей

Норма	$\leq 0,35$	$\geq 0,5$	$< 0,5$
Гетерозиготное носительство	$\geq 0,5$	$\geq 0,5$	0,5-2,0
Гомозиготное носительство мутации	$\geq 0,5$	$\leq 0,35$	$> 2,0$

5. Протокол идентификации лейденской мутации V, мутаций G20210A гена протромбина и C677T гена МТГФР методом мультиплексной амплификации и гибридизации с аллель-специфичными олигонуклеотидами в образцах крови, высушенных на бумажных бланках

Полимеразная цепная реакция

С помощью пинцета от сухого пятна крови отделить кусочек диаметром примерно 0,5 мм и поместить его в промаркированные пробирки для проведения ПЦР. Бранши пинцета обработать спиртом и обжечь пламенем, чтобы предотвратить перекрестную контаминацию. Затем в пробирки для ПЦР добавить 15 мкл Amplification mix ThromboRisk и каплю масла. Инкубировать в амплификаторе 15 мин при температуре 45 °С, затем 20 мин при температуре 96 °С и 5 мин при температуре 72 °С. Во время инкубации составить общую реакционную смесь в соответствии с табл. 6.

Таблица 6

Состав общей реакционной смеси, предназначенной для идентификации лейденской мутации V, мутаций G20210A гена протромбина и C677T гена МТГФР в сухих пятнах крови

Компонент	Объем, мкл на одну пробу
Amplification mix ThromboRisk	4,0
Taq-полимераза (5 ед./мкл)	0,4
Общий объем	4,4

Все компоненты смешать в указанной последовательности в конической пластиковой пробирке на 0,5 мл. Taq-полимеразу добавить непосредственно перед переносом смеси в пробирки для проведения амплификации и тщательно перемешать с помощью пипетки. Когда температура в амплификаторе достигнет 72 °С, добавить в каждую пробирку под масло 4,4 мкл общей реакционной смеси. Далее амплификацию проводить в соответствии с протоколом.

Протокол амплификации:

- | | | |
|----------|-------|-------------|
| 1. 94 °С | 5 мин | } 15 циклов |
| 2. 94 °С | 30 с | |
| 3. 66 °С | 20 с | |

4. 72 °С	20 с	} 25 циклов
5. 72 °С	2 мин	
6. 94 °С	30 с	
7. 58 °С	30 с	
8. 72 °С	30 с	
9. 72 °С	5 мин	

Постамплификационная обработка, гибридизация с аллель-специфичными олигонуклеотидами, детекция методом иммуноферментного анализа и визуальная оценка результатов проводятся так же, как и в предыдущем разделе.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ПРИМЕНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Перечень возможных затруднений и ошибок, путей их устранения представлен в табл. 7.

Таблица 7

Возможные ошибки и затруднения при применении молекулярно-генетических методов диагностики наследственных форм тромбофилии и пути их устранения

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложноположительные результаты	1. Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом	Соблюдение принципов зонирования лаборатории для молекулярно-генетических исследований Использование стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов Использование отрицательного контроля (пробы, не содержащей ДНК) в каждой серии исследований Проведение повторного анализа положительных проб
	2. Неправильная постамплификационная обработка 3. Снижение (утрата) активности рестриктаз	Тщательное соблюдение пропорций исходных растворов при приготовлении смеси для постамплификационной обработки Тщательное перемешивание исходных растворов при приготовлении смеси для постамплификационной обработки и готовой реакционной смеси с продуктами амплификации Использование контрольных образцов

		ДНК (с известной последовательностью нуклеотидов)
<p>Несоответствие полученных значений оптических плотностей рекомендуемым параметрам:</p> <p>1. Низкая оптическая плотность</p> <p>2. Оптические плотности 0,35–0,5 (высокий фоновый сигнал)</p>	<p>1. Отсутствие образования иммунного комплекса (инактивация комплекса меченых пероксидазой антител)</p> <p>2.а Загрязнение, окисление субстрата</p> <p>2.б Недостаточная отмывка микропланшета для проведения ИФА</p> <p>2.в Неправильная постамплификационная обработка</p>	<p>Использование свежеприготовленного раствора комплекса меченных пероксидазой антител</p> <p>Контроль выполнения всех этапов проведения ИФА</p> <p>Соблюдение температурных условий проведения ИФА.</p> <p>Соблюдение условий хранения реагентов ($t = 4-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, избежание воздействия прямых солнечных лучей)</p> <p>Визуальный контроль окраски субстрата перед использованием.</p> <p>Применение автоматических приборов для промывки микропланшетов</p> <p>Тщательное соблюдение пропорций исходных растворов при приготовлении смеси для постамплификационной обработки</p> <p>Тщательное перемешивание исходных растворов при приготовлении смеси для постамплификационной обработки и готовой реакционной смеси с продуктами амплификации</p>