

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра  
Д.Л. Пиневиц

2016 г.

Регистрационный № 156-1115

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ  
РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ  
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННО ОБУСЛОВЛЕННОЙ  
ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ**  
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и  
экологии человека»

АВТОРЫ:

к.б.н. Силин А.Е., к.м.н. Коротаев А.В., Мартинков В.Н., Силина А.А.,  
Тропашко И.Б., Мартыненко С.М., Кривун Т.П.

Гомель, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
20.05.2016

Регистрационный № 156-1115

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ  
РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ  
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННО ОБУСЛОВЛЕННОЙ  
ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.Е. Силин, канд. мед. наук А.В. Коротаев, В.Н. Мартинков, А.А. Силина, И.Б. Тропашко, С.М. Мартыненко, Т.П. Кривун

Гомель 2015

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

LDLR — ген рецептора липопротеинов низкой плотности (low density lipoprotein receptor)

ПЦР — полимеразная цепная реакция

НТФ — нуклеотидтрифосфаты

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС — ишемическая болезнь сердца

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

SSCP — метод анализа конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (single-stranded conformation polymorphism)

TEMED — тетраметилэтилендиамин (tetramethylethylenediamine)

APS — персульфат аммония (ammonium persulfate)

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод молекулярно-генетического анализа полной кодирующей последовательности гена рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) с целью выявления наличия клинически значимых мутаций и генетических полиморфизмов, связанных с высоким риском развития наследственной гиперхолестеринемии.

Предназначена для врачей-генетиков, врачей-кардиологов, врачей-терапевтов, врачей лабораторной диагностики.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Высокоскоростная микроцентрифуга (до 10000–12000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» 1,5 мл.

2. Твердотельный термостат.

3. Микроцентрифуга-вортекс.

4. Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл).

5. Насос с колбой-ловушкой.

6. ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха.

7. Спектрофотометр для определения количества и качества выделенной ДНК.

8. Амплификатор ДНК.

9. Камера для горизонтального или вертикального полиакриламидного геле-электрофореза.

10. Источник питания с постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 600 В.

11. Камера для окраски гелей с использованием нитрата серебра.

12. Генетический анализатор (секвенатор).

13. Набор расходных материалов: резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10; 20; 200; 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 или 2 мл, ПЦР-пробирки на 0,2 мл, штативы для пробирок на 1,5 и 0,2 мл, стеклянная химическая посуда и др.

14. Набор реагентов для пробоподготовки и проведения ПЦР включает в себя следующие компоненты: готовый коммерческий набор для экстракции ДНК из крови, буферный раствор для ПЦР, термостабильная ДНК-полимераза для «горячего старта» (Hot Taq-полимераза), 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, смесь НТФ, специфические олигонуклеотидные праймеры 10 мМ раствор, вода ПЦР-качества, компоненты для приготовления полиакриламидного геля, буферных растворов для электрофореза, реагенты для окраски гелей нитратом серебра, комплект реагентов для секвенирования фрагментов ДНК методом Сенгера.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Наличие клинических признаков семейной гиперхолестеринемии (МКБ 10: E78.0; E78.2; E78.4; E78.5; E78.8; E78.9): дебют ИБС (МКБ 10: I20–I25) в возрасте 30–40 лет; уровень общего холестерина >7 ммоль/л; уровень липопротеинов низкой плотности >4 ммоль/л; туберозные ксантомы (МКБ 10: E78.2), ксантелазмы, липоидная дуга роговицы; наличие у пациента родственников первой или второй степени родства с аналогичной патологией.

2. Каскадный генетический скрининг кровных родственников пациентов, у которых выявлен генетический дефект.

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### 1. Материал для исследования и пробоподготовка

Материалом для выделения ДНК с целью анализа мутаций и генетических полиморфизмов гена LDLR является цельная венозная кровь. Материал объемом 1 мл после забора переносится в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5 М ЭДТА (финальная концентрация 50 мМ). Выделение и очистка образцов ДНК осуществляется обычным доступным способом посредством соответствующих наборов реагентов.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при температуре от +2 до +8°C. Более длительное хранение проводится при температуре -20°C.

### 2. Полимеразная цепная реакция

#### 2.1. Специфические олигонуклеотидные праймеры

Анализ мутаций и генетических полиморфизмов гена LDLR осуществляется в пределах 1–18-го экзонов, а также в промоторной области. Для амплификации фрагментов ДНК, в пределах которых локализованы исследуемые генетические варианты, используются пары специфических олигонуклеотидных праймеров. Их основные характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР

№ п/п	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, п.н.	Температура отжига, °C
1	LDLR_Pr_F	CAGCTCTTCACCGGAGACC	278	54
2	LDLR_Pr_R	ACCTGCTGTGTCCTAGCTGG		
3	LDLR_1_F	CACATTGAAATGCTGTAAATGACG	215	58
4	LDLR_1_R	CTATTCTGGCGCCTGGAGCAAGC		
5	LDLR_2_F	TTGAGAGACCSTTTCTCSTTTTCC	184	59
6	LDLR_2_R	TGCATATCATGCCCAAAGGGG		
7	LDLR_3_F	TTCSTTTGAGTGACAGTTCAATCC	196	56
8	LDLR_3_R	GATAGGCTCAATAGCAAAGGCAGG		
9	LDLR_4A_F	GTTGGGAGACTTCACACGGTGATGG	356	62
10	LDLR_4A_R	ACTTAGGCAGTGGAACCTCGAAGGCC		
11	LDLR_4B_F	CCCCAGCTGTGGGCCTGCGACAACG	269	62
12	LDLR_4B_R	GGGGGAGCCCAGGGACAGGTGATAG		
13	LDLR_5_F	AGAAAATCAACACACTCTGTCTCTG	180	58
14	LDLR_5_R	GGAAAACCAGATGGCCAGCG		
15	LDLR_6_F	TCCTCCTTCCTCTCTCTGGC	179	56
16	LDLR_6_R	TCTGCAAGCCGCCTGCACCG		
17	LDLR_7_F	GGCGAAGGGATGGGTAGGGG	236	57
18	LDLR_7_R	GTTGCCATGTCAGGAAGCGC		

19	LDLR_8_F	CATTGGGGAAGAGCCTCCCC	220	66
20	LDLR_8_R	GCCTGCAAGGGGTGAGGCCG		
21	LDLR_9_F	CCCCTGACCTCGCTCCCCGG	224	66
22	LDLR_9_R	GCTGCAGGCAGGGGCGACGC		
23	LDLR_10_F	ATGCCCTTCTCTCCTCCTGC	278	58
24	LDLR_10_R	AGCCCTCAGCGTCGTGGATA		
25	LDLR_11_F	TCCTCCCCCGCCCTCCAGCC	194	66
26	LDLR_11_R	GCTGGGACGGCTGTCCTGCG		
27	LDLR_12_F	GCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT	209	56
28	LDLR_12_R	CACCTAAGTGCTTGCATCTCGTACG		
29	LDLR_13_F	GTCATCTTCTTGCTGCCTG	217	62
30	LDLR_13_R	TTCCACAAGGAGGTTTCAAGGTTGGGGGGG		
31	LDLR_14_F	AAATTTCTGGAATCTTCTGG	288	59
32	LDLR_14_R	GCAGAGAGAGGCTCAGGAGG		
33	LDLR_15_F	CCTGACTCCGCTTCTTCTGCCCCAG	203	60
34	LDLR_15_R	CGCAGAAACAAGGCGTGTGCCACAC		
35	LDLR_16_F	CCTTCCTTTAGACCTGGGCC	173	58
36	LDLR_16_R	CATAGCGGGAGGCTGTGACC		
37	LDLR_17_F	GGGTCTCTGGTCTCGGGGGC	240	58
38	LDLR_17_R	GGCTCTGGCTTTCTAGAGAGGG		
39	LDLR_18_F	TCCGCTGTTTACCATTGTGGCAG	126	57
40	LDLR_18_R	AATAAAACAAGGCCGGCGAGGTCTC		

## 2.2. Условия проведения полимеразной цепной реакции

Смесь реагентов для одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР-буфер (200 мМ Трис-НСl pH = 8,3, 200 мМ КСl, 50 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 мкл 10 мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 2,5 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5 ед./мкл), 1 мкл образца ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. Для ПЦР необходимо использовать специальные пробирки объемом 0,2 мл. ПЦР проводится в амплификаторе с подогреваемой крышкой.

Программа для амплификации анализируемых фрагментов ДНК выглядит следующим образом: начальная денатурация — 5 мин при 95°C, затем 35 циклов 1-минутной денатурации при 95°C, отжиг праймеров — 1 мин при соответствующей температуре (таблица 1) и элонгация 2 мин при 72°C. В завершении — финальная элонгация 5 мин при 72°C и охлаждение до 4°C.

## 3. Электрофоретическая детекция результатов ПЦР

Предлагаемый метод выявления мутаций и генетических полиморфизмов гена LDLR основан на методе анализа однонитевого конформационного полиморфизма (SSCP). Этот метод позволяет выявлять наличие нуклеотидных замен, делеций и инсерций на протяжении всей длины амплифицированного продукта. Метод SSCP заключается в следующем: продукт амплификации денатурируют, и полученные однонитевые молекулы разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

### 3.1. Подготовка геля и буферных растворов

Электрофорез осуществляется в горизонтальной или вертикальной камере для полиакриламидного гель-электрофореза. Ниже описан метод постановки

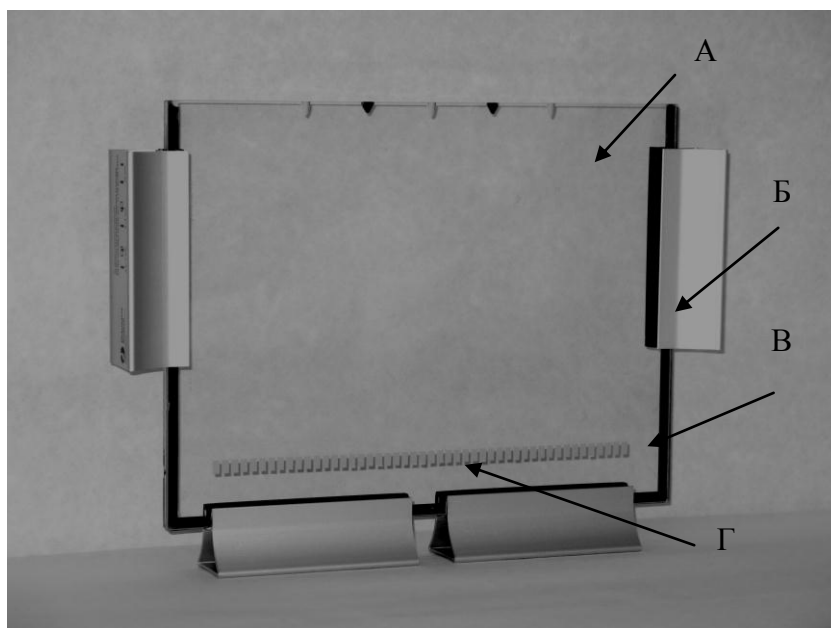
полиакриламидного неденатурирующего гель-электрофореза в горизонтальной камере с принудительным охлаждением.

Для приготовления геля и проведения электрофореза необходимо предварительно приготовить несколько растворов (таблица 2).

Таблица 2 — Состав основных растворов для проведения электрофореза

Раствор/компонент	Количество
<b><i>Акриламид:бис-акриламид (T = 30%, C = 2%)</i></b>	
акриламид	29,4 г
бис-акриламид	0,6 г
вода дистиллированная и деионизированная (д/д)	до 100 мл
<b><i>Акриламид:бис-акриламид (T = 30%, C = 3%)</i></b>	
акриламид	29,1г
бис-акриламид	0,9 г
вода (д/д)	до 100 мл
<b><i>Гелевый буфер 0,448 М Трис-ацетат pH 6,4 (4x концентр.)</i></b>	
трис	5,4 г
уксусная кислота (лед.)	до pH = 6,4
вода (д/д)	до 100 мл
<b><i>Анодный буфер 0,45 М Трис-ацетат pH 8,4</i></b>	
трис	27,3 г
вода (д/д)	400 мл
уксусная кислота (лед.)	до pH 8,4
вода (д/д)	до 500 мл
<b><i>Катодный буфер 0,08 М Трис/0,8 М Трицин</i></b>	
трис	4,9 г
трицин	71,7 г
вода (д/д)	до 500 мл
<b><i>Раствор персульфата аммония (APS) 40%</i></b>	
персульфат аммония	400 мг
вода (д/д)	до 1 мл
<b><i>Загрузочный буфер</i></b>	
гелевый буфер	3,0 мл
бромфеноловый синий 1%	100 мкл
ЭДТА 0,2 М	250 мкл
вода (д/д)	до 25 мл

Полиакриламидные гели для электрофореза готовят на поддерживающей пленке из полиэстера при помощи специального дополнительного набора аксессуаров (рисунок 1), включающего два стекла с прокладкой для формирования толщины геля и зажимы для скрепления стекол во время полимеризации.



А — стекла; Б — зажим для скрепления стекол во время полимеризации геля;  
 В — прокладка уплотнительная, определяющая толщину геля; Г — наклейки  
 для формирования загрузочных лунок

**Рисунок 1 — Стенд для приготовления полиакриламидных гелей в собранном виде**

При помощи данного стенда готовят гель с размерами 25×14 см и 1 мм толщиной. Для приготовления одного геля используются компоненты в пропорциях, указанных в таблице 3.

Концентрирующий гель заливается в первую очередь, а затем на концентрирующий гель наслаивается разделяющий гель. Стенд для приготовления геля предварительно охлаждают в холодильной камере. Через 2 ч после заливки гель готов к проведению электрофореза.

**Таблица 3 — Состав реагентов для формирования одного полиакриламид-ного геля**

Компоненты геля	Концентрирующий гель, Т = 4%, С = 3%	Разделяющий гель, Т = 12%, С = 2%
Глицерин	2,0 мл	0,5 мл
Акриламид:бис-Акриламид Т = 30%, С = 2%	—	10,0 мл
Акриламид:бис-Акриламид Т = 30%, С = 3%	1,3 мл	—
Гелевый буфер	2,5 мл	6,3 мл
Вода (д/д)	4,2 мл	8,3 мл
TEMED	6,0 мкл	14,0 мкл
APS 40% (добавляется непосредственно перед заливкой геля)	15,0 мкл	35,0 мкл

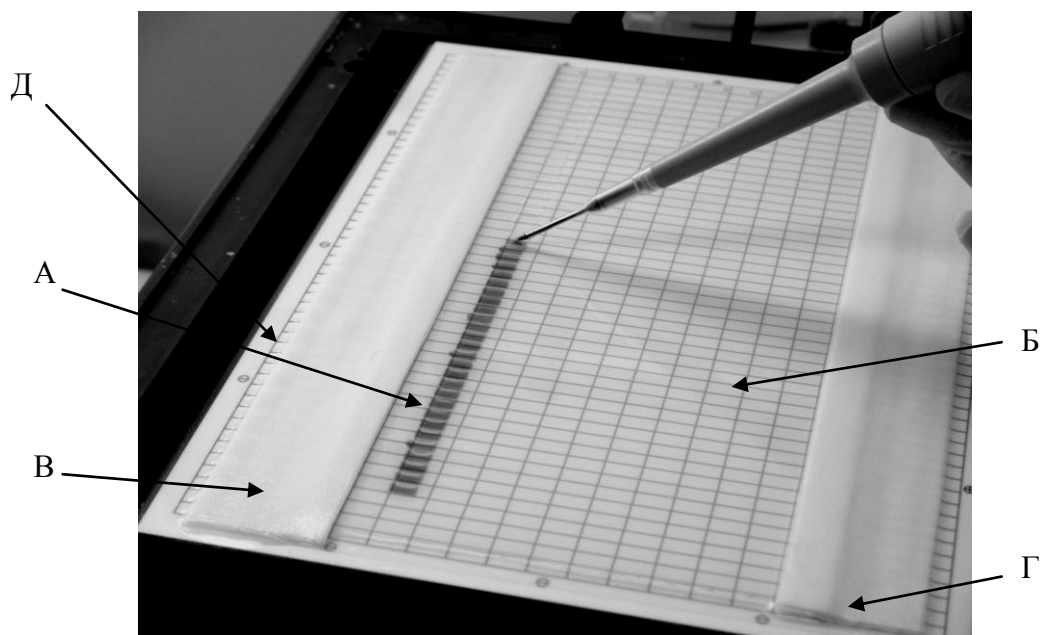


### 3.2. Электрофоретическое фракционирование

Для SSCP-анализа следующим после ПЦР является этап денатурации продуктов амплификации с целью получения однонитевых фрагментов ДНК. Для этого в пробирку с продуктами амплификации добавляется формамид, содержащий краситель бромфеноловый синий (на 25 мл формамида 10 мг бромфенолового синего) в пропорции 1:2. Затем пробирку помещают в термостат на 5 мин при температуре 98°C. По окончании этого этапа пробирку быстро перемещают в кювету с ледяной водой на 5 мин и непосредственно после этого образцы наносят в загрузочные лунки геля объемом 7 мкл пипеточным дозатором с индивидуальными наконечниками для каждого образца (рисунок 2).

Для оценки молекулярного веса анализируемых фрагментов в одну из свободных лунок вносится образец маркера молекулярного веса. Наиболее удобными являются маркеры с фрагментами от 50 до 800–1000 пар нуклеотидов с шагом в 50 пар нуклеотидов.

Для осуществления контакта электродов с гелем используются буферные полоски из трехслойной фильтровальной бумаги шириной 5 см, которые накладываются по всей ширине, захватывая 2 см геля с катодной и анодной стороны (рисунок 2). Бумага пропитывается 15 мл соответствующего электродного буфера (таблица 2). После накладки электродов на буферные полоски электрофоретическая камера подсоединяется к источнику питания. Начальными параметрами тока для электрофореза с использованием вышеописанного геля являются 600 В/100 мА/30 Вт. Электрофоретическое фракционирование осуществляется в течение 1 ч 45 мин при температуре рабочей поверхности камеры 15°C.



А — лунки с образцами; Б — гель; В — катодная буферная полоска; Г — анодная буферная полоска; Д — охлаждаемая рабочая поверхность электрофоретической камеры с керамическим покрытием

**Рисунок 2 — Расположение геля в электрофоретической камере и нанесение образцов**

Контроль процесса электрофореза осуществляется визуально по мере продвижения синей бромфеноловой метки от катода к аноду. Электрофорез прекращается, когда метка находится в 1 см от анодной буферной полоски.

### 3.3. Окраска геля с использованием нитрата серебра

Окраска геля с использованием нитрата серебра может осуществляться как вручную, так и в специальной камере. Процесс окрашивания протекает в 5 этапов. Объем раствора для каждого из этапов составляет 200 мл. В таблице 4 представлены составы окрашивающих растворов и время инкубации геля на каждом из этапов.

Таблица 4 — Состав растворов и время инкубации на каждом из этапов окраски полиакриламидного геля с использованием нитрата серебра

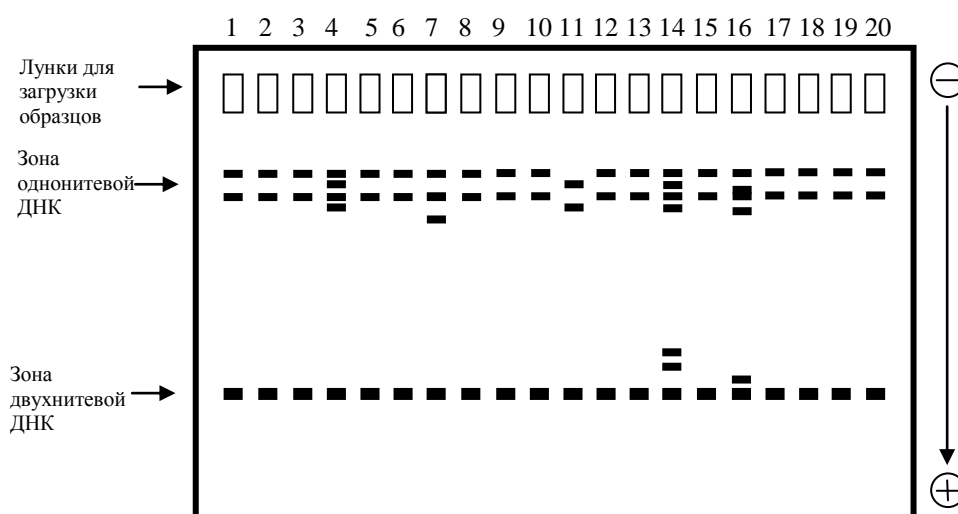
Этап/раствор	Количество реагента/время
<i>I этап — фиксирующий раствор</i>	
натриевая соль сульфобензойной кислоты	1,25 г (0,7%)
этиловый спирт	50 мл (24%)
серная кислота (конц.)	0,5 мл (до pH = 1,0)
вода (д/д)	до 200 мл
время инкубации	40 мин
<i>II этап — окрашивающий раствор</i>	
нитрат серебра	0,4 г (0,2%)
натриевая соль сульфобензойной кислоты	0,14 г (0,07%)
вода (д/д)	до 200 мл
время инкубации	40 мин
<i>III этап — промывка</i>	
вода (д/д)	200
время инкубации	2 мин
<i>IV этап — проявляющий раствор</i>	
карбонат натрия	5 г (2,5%)
формальдегид 37% (вносить непосредственно перед окраской)	0,4 мл (0,074%)
тиосульфат натрия 2% (вносить непосредственно перед окраской)	0,4 мл (0,2%)
вода (д/д)	до 200 мл
время инкубации	5–7 мин до появления четких фракций ДНК
<i>V этап — остановка реакции и консервация геля</i>	
уксусная кислота (лед.)	2 мл (1%)
ацетат натрия	10 г (5%)
глицерин	20 г (10%)
вода (д/д)	до 200 мл
время инкубации	40 мин

При выявлении фактов однонитевого конформационного полиморфизма или наличия гетеродуплексного паттерна образцы ДНК секвенируются с использованием генетического анализатора капиллярного типа по методу Сенгера. Секвенирующая реакция осуществляется как с прямым, так и с обратным праймером (таблица 1) с использованием реагентов из набора для секвенирования.

#### 4. Интерпретация результатов анализа

При генетическом тестировании обязательно включение в серию тестов отрицательного контроля в виде образца ДНК без мутаций. Это необходимо для визуального анализа паттернов (пространственного расположения фракций на геле) в зоне однонитевой ДНК. Кроме изменения паттернов в области однонитевой ДНК, обычно характерных для однонуклеотидных замен, могут наблюдаться гетеродуплексные паттерны в виде дополнительных медленно мигрирующих фракций в зоне двухнитевой ДНК. Гетеродуплексные фракции часто формируются при наличии инсерции или делеции нуклеотидов. Любое отличие анализируемого паттерна от контрольного является основанием для последующего секвенирования данного образца ДНК с целью расшифровки его нуклеотидной последовательности.

Наиболее характерные паттерны, свидетельствующие об измененной структуре ДНК, схематично представлены на рисунке 3.



Дорожки 4, 7, 11, 14, 16 — примеры измененных паттернов в области однонитевой ДНК; дорожки 14 и 16 — примеры типичных гетеродуплексных паттернов

**Рисунок 3 — Схематическое изображение полиакриламидного геля после окраски нитратом серебра с типичными проявлениями конформационного полиморфизма**

Результаты секвенирования анализируются посредством сравнения выявленной измененной последовательности ДНК с базами данных, находящимися в открытом доступе сети Интернет (OMIM, dbSNP, LOVD v.2.0).

Описанный метод молекулярно-генетического анализа является частью комплексного диагностического обследования пациентов с подозрением семейной гиперхолестеринемии.

Алгоритм диагностики пациентов с подозрением семейной гиперхолестеринемии представлен на рисунке 4.



**Рисунок 4 — Алгоритм диагностики пациентов с подозрением семейной гиперхолестеринемии**

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

В процессе молекулярно-генетического анализа наиболее распространенным признаком методических нарушений является слабая амплификация исследуемых фрагментов ДНК либо отсутствие амплификации. Это проявляется в виде нечетких фракций либо в их отсутствии после окраски электрофоретических гелей. Причин неудовлетворительных результатов может быть несколько. Основными из них являются низкая либо крайне высокая концентрация исходного образца ДНК (оптимальная концентрация должна быть в пределах 10–50 нг/мкл), неправильно составленная программа амплификации, ошибки в последовательности нуклеотидов используемых в ПЦР олигонуклеотидных праймеров, использование реагентов с истекшим сроком годности.