

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич

29.04.2011 г.

Регистрационный № 161-1110

**МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ВЫСОКИМ РИСКОМ РАННЕГО
ПРОГРЕССИРОВАНИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ НА
ОСНОВЕ
АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ACE**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Сурга Е.В., канд. мед. наук Воропаев Е.В., канд. биол. наук Баранов О.Ю.
канд. мед. наук Платошкин Э.Н., Доценко В.Н., Осипкина О.В.

Гомель 2011

Целью данной инструкции является описание технологического процесса анализа I/D полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ), играющего ключевую роль в функционировании ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Методологические принципы выявления полиморфного маркера гена АСЕ основаны на определении наличия/отсутствия фрагмента длиной 287 пар нуклеотидов (п.н.) в исследуемом ДНК-фрагменте в крови пациента методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данная технология может быть использована для молекулярно-генетической оценки наследственной отягощенности пациентов по полиморфизму I/D гена АСЕ и как дополнительный критерий для формирования групп повышенного риска раннего прогрессирования артериальной гипертензии (АГ) до III степени в ходе диагностических исследований, проводимых в специализированных лабораториях областных и республиканских учреждений здравоохранения.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Лабораторное оборудование, применяемое для анализа полиморфных маркеров различных генов, должно позволять проводить все необходимые этапы работы с дезоксирибонуклеиновыми кислотами: выделение из биологического материала, амплификацию с верификацией продуктов амплификации методом электрофореза.

В таблице 1 приведен оптимальный вариант набора оборудования для организации работ, связанных с анализом полиморфных маркеров различных генов методом ПЦР.

Таблица 1

Оптимальный набор оборудования

Наименование оборудования и основные характеристики	Количество
<i>Пробоподготовка</i>	
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10 000–15 000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур от 0 до +25 °С	1
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10 до + 99 °С	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10, 5–50, 20–200, 100–1000 мкл)	1
Насос с колбой-ловушкой	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 °С	1
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 °С	
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот	1
УФ-стерилизатор или его аналог	1
<i>Проведение ПЦР</i>	
Амплификатор (термоциклер), предназначенный для проведения ПЦР	1

ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10, 5–50 (2 шт), 20–200, 100–1000 мкл)	1
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10 до + 99 °С	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 °С	1
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 °С	
<i>Анализ результатов амплификации методом электрофореза</i>	
Система для проведения гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10, 5–50, 20–200 мкл)	1
УФ-трансиллюминатор	1
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером и принтером	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 °С	1
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 °С	1

Набор расходных материалов и лабораторных аксессуаров: резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, ПЦР-пробирки соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера), штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

В таблице 2 приведен список реагентов для проведения различных этапов анализа полиморфных маркеров различных генов методом ПЦР. Следует отметить, что качество используемых реагентов, включая воду и солевые растворы, должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-генетических исследований.

Таблица 2

Список реагентов, необходимых для проведения анализа полиморфных маркеров

Наименование реагентов
<i>Выделение ДНК</i>
Раствор для лизиса эритроцитов (раствор хлорида аммония)
Раствор для лизиса клеток (раствор, содержащий протеазу)
<i>Проведение ПЦР</i>
Трис
Хлорид магния
Хлорид калия
дНТФ
Олигонуклеотиды (праймеры)
Термостабильная ДНК-полимераза с 5'-3' экзонуклеазной активностью
<i>Электрофорез и окраска</i>
Агароза
Трис
Борная кислота
ЭДТА
Этидиумбромид

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Генетический скрининг наследственной предрасположенности к раннему (до 55 лет) прогрессированию АГ до III степени у лиц с отягощенным семейным анамнезом по сердечно-сосудистой патологии.

2. Дополнительный лабораторный критерий для формирования групп повышенного риска раннего (до 55 лет) прогрессирования АГ.

Технология, предложенная в разработанной нами инструкции, является наиболее оптимальным лабораторным методом, позволяющим выявлять полиморфный маркер I/D гена ACE, что является необходимым для выявления лиц с прогнозом раннего прогрессирования АГ, и может быть применена в специализированных лабораториях медицинских и научных учреждений.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Не выявлены.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗУЕМОГО МЕТОДА

Материал для исследования

Материалом для выделения ДНК с целью определения полиморфного маркера I/D гена ACE является цельная венозная кровь. Кровь для анализа объемом около 1000 мкл помещается в центрифужную пробирку 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5М ЭДТА для предотвращения свертывания крови. Хранение образцов крови производится в холодильной камере при 2–4°C.

Выделение ДНК

Для получения препаратов ДНК предлагается следующая методика. В одноразовые пробирки объемом 1,5 мл добавляют по 1,0 мл раствора для лизиса эритроцитов, маркируют пробирки. Затем в пробирки вносят по 0,25 мл цельной крови, закручивают крышку и перемешивают на вортексе. Оставляют пробирки при комнатной температуре на 5 мин, еще раз перемешивают и оставляют на 5 мин. Далее центрифугируют при 6000 об./мин в течение 3 мин. Отбирают, не задевая осадка, надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Затем к осадку добавляют 0,5 мл раствора для лизиса клеток, перемешивают на вортексе и оставляют на 5 мин. Центрифугируют при 6000 об./мин в течение 3 мин. Отбирают, не задевая осадка, надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру отмывки повторяют еще 1 раз. После этого к осадку лейкоцитов добавляют 0,1 мл раствора для лизиса клеток, сразу же тщательно ресуспендируя клеточный осадок, используя наконечники с аэрозольным барьером. Перемешивают на вортексе. Пробирки ставят в термостат на 30 мин при 60 °С, через каждые 10 мин перемешивая на вортексе для лучшего растворения клеточного осадка. Затем переустанавливают температуру на 95 °С и выдерживают 20 мин. Центрифугируют при 10000 об./мин в течение 3 мин. Супернатант содержит ДНК, которую используют в ПЦР. Количество полученной ДНК в препарате оценивают с помощью спектрофотометра.

Проведение ПЦР

Методикой проведения генетического анализа с целью детекции полиморфизма I/D гена ACE является классическая ПЦР с верификацией продуктов амплификации методом электрофореза.

Для проведения ПЦР используются два специфических праймера (forward и revers). Структура праймеров, используемых для детекции полиморфного маркера I/D гена ACE, представлена в таблице 3.

Таблица 3

Структура праймеров, используемых для детекции полиморфного маркера I/D гена ACE

Название локуса	Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Молекулярный вес фрагмента
I/D ACE	ACE F	GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT	597 и 319 п.н.
	ACE R	GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC	

Далее представлены условия проведения ПЦР.

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 10×ПЦР-буфер (100 мМ р-р Трис-НСl, рН 9,0, 500 мМ р-р хлорида калия, 25 мМ р-р хлорида магния) — 2,5 мкл, смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ, 10 мМ р-р каждого) — 0,5 мкл, праймер SOD2F (10 мМ р-р) — 1 мкл, праймер SOD2R (10 мМ р-р) — 1 мкл, Таq ДНК-полимераза (5 ед/мкл) — 0,2 мкл, образец ДНК (20 нг/мкл) — 1 мкл. Конечный объем доводится водой до 25 мкл.

Обычно для проведения ПЦР более 1 образца готовится общий раствор (Master mix), в который входят все компоненты смеси в количестве, соответствующем числу образцов, кроме образца ДНК. Образец вносится индивидуально в каждую пробирку, содержащую аликвотированный (на 1 анализ) Master mix.

Программа амплификации:

1 этап (1 цикл): Денатурация. t=2 мин, T=94 °С. 2 этап (30 циклов): Денатурация. t=20 сек, T=91 °С. Отжиг. t=15 сек, T=68 °С. Элонгация. t=20 сек, T=72 °С. 3 этап (1 цикл): Охлаждение реакционной смеси. t=5 мин, T=4 °С.

Для верификации продуктов амплификации используют метод электрофореза.

Принцип электрофоретического фракционирования в агарозном геле фрагментов ДНК основан на том, что смесь их макромолекул под действием электрического поля делится на ряд фракций в зависимости от размера фрагмента и конформационной структуры. Для агарозных гелей чаще применяются горизонтальные камеры. Однородные фрагменты ДНК будут мигрировать при электрофорезе совместно и представлять на электрофореграмме единую фракцию. При наличии в смеси фрагментов, различающихся первичной последовательностью, например, вследствие

полиморфизма, определенные условия электрофореза дают возможность выявить данные различия по изменению электрофоретической подвижности «мутантной» фракции по отношению к «нормальной». При этом наиболее важной составляющей подготовки и проведения электрофоретического фракционирования является подбор оптимальных условий электрофореза.

Продукты амплификации анализируют в 1,7% агарозном геле. Для приготовления 1,7% агарозного геля 1,7 г агарозы растворяют в 100 мл Трис-ЭДТА-Боратного (ТБЕ) буфера путем нагревания смеси. Состав ТБЕ-буфера представлен в таблице 4.

Таблица 4

Состав Трис-ЭДТА-Боратный (ТБЕ) буфера (рН 8,3)

Наименование компонента	Количество
Трис	12,1 г
Борная кислота	5,1 г
ЭДТА	0,37 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Затем горячий раствор заливают в специальную кювету. Вставляют пластмассовые гребенки для формирования лунок в геле. После полимеризации гель помещается в камеру. Далее отсеки камеры наполняют электрофоретическим буфером, так, чтобы слой буфера над гелем составил 5-7 мм. В лунки геля с помощью пипетки вносят образцы (5 мкл), смешанные с буфером для загрузки (2 мкл). Камеру плотно закрывают, подсоединяют электроды и подключают к универсальному источнику питания. Напряжение, сила тока и время электрофореза подбирают эмпирически.

После электрофоретического фракционирования гель кладут в кювету, где и производят окрашивание в растворе бромистого этидия (0,01%) с последующей визуализацией под ультрафиолетовым светом.

В результате амплификации участка ДНК гена ACE, содержащего полиморфный маркер I/D (Insertion/Deletion), получается фрагмент длиной 597 п.н., соответствующий аллелю I, и/или фрагмент длиной 319 п.н., соответствующий аллелю D. Таким образом, спектр гомозиготы по аллелю дикого типа представлен зоной 597 п.н., гетерозиготного организма — двумя зонами (597 и 319 п.н.), гомозиготного по мутантному аллелю — зоной 319 п.н.

На рис. 1 приведен пример электрофореза продуктов ПЦР гена ACE.

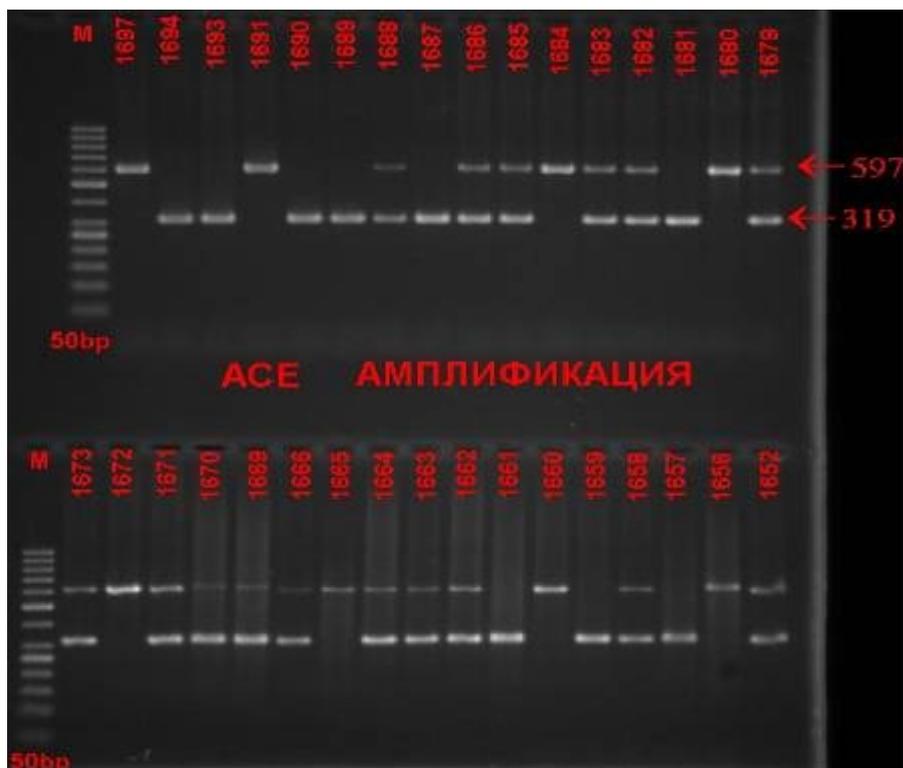


Рис. 1 — Электрофорез продуктов ПЦР гена АСЕ
 *M50bp — маркер молекулярного веса

Как видно из рис., гомозиготные мутантные образцы (1657, 1659, 1661, 1681, 1687, 1689, 1690, 1693, 1694) имеют одну зону размером 319 п.н., образцы дикого типа (1656, 1660, 1665, 1672, 1680, 1684, 1691, 1697) — размером 597 п.н.; остальные образцы имеют обе зоны и являются гетерозиготами.

Интерпретация результатов

- пациенты, образцы которых на электрофореграмме имеют две зоны 597 и 319 п.н. (гетерозиготы), обладают наследственной предрасположенностью к раннему прогрессированию артериальной гипертензии по результатам генотипирования по гену АСЕ;
- пациенты, образцы которых на электрофореграмме имеют одну зону 597 или 319 п.н. (гомозиготы) не имеют наследственной предрасположенности к раннему прогрессированию артериальной гипертензии по результатам генотипирования по гену АСЕ.

Возможные ошибки при проведении ПЦР

Использование методики ПЦР подразумевает строгое следование всем правилам организации и проведения исследования в ПЦР-лаборатории, несоблюдение которых приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов. С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа. Это, прежде всего, ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб. Не рекомендуется в качестве антикоагулянта при заборе крови использовать гепарин, так как он ингибирует

ПЦР. Хранение образцов крови производится в холодильной камере при 2–4 °С не более одной недели.

Сотрудники ПЦР-лаборатории должны неукоснительно соблюдать санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории. Особую опасность представляет собой контаминация (источник ложноположительных результатов) загрязненными реагентами, инструментарием, продуктами ПЦР и перекрестная контаминация от пробы к пробе. Особенно сложно выявить случаи контаминации в отдельных пробах. Это можно сделать при выделении ДНК и постановке реакции в 2 или 3-х параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Эпизодические случаи появления линии «положительной» ДНК в отрицательном контроле свидетельствуют о возможности контаминации и в пробах.