

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич  
12.12.2012  
Регистрационный № 165-1112

**ТЕХНОЛОГИЯ СКАНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ НУКЛЕОТИДНОЙ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК  
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ  
И ВРОЖДЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук И.В. Наумчик, О.А. Якуц, канд. биол. наук К.А. Моссэ,  
канд. биол. наук Н.И. Моссэ, канд. биол. наук Т.В. Осадчук, канд. биол. наук  
Ю.В. Цукерман

Минск 2012

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлена универсальная ДНК-диагностика, которая может быть использована для выявления наследственных и врожденных заболеваний человека, таких как фенилкетонурия, муковисцидоз, торсионная дистония, церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL), адренолейкодистрофия (АЛД) и т. д.

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

### **Биологический материал**

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, и небольшие фрагменты пятен крови, высушенных на специальных бланках.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Молекулярно-генетический анализ проводится лицам с наследственной и врожденной патологией, родственникам пробандов, в семьях с отягощенным наследственным анамнезом, а также для пренатальной диагностики.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **1. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

*Материалы и оборудование:* программируемый нагревательный блок (амплификатор), миницентрифуга, пробирки объемом 1,5 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

*Реактивы:* Taq полимераза, соответствующий 10X буфер для ПЦР, 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), олигонуклеотидные праймеры, бидистиллированная деионизированная вода.

#### ***Проведение дВЭЖХ***

*Материалы и оборудование:* жидкостной хроматограф в комплектации, позволяющей выполнять анализ по технологии дВЭЖХ, рН-метр, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

*Реактивы:* триэтиламин, ацетонитрил, Na<sub>2</sub>EDTA, ледяная уксусная кислота, бидистиллированная вода.

#### ***Проведение секвенирования***

*Материалы и оборудование:* генетический анализатор, амплификатор, миницентрифуга, пробирки объемом 1,5 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

*Реактивы:* набор для секвенирования, 5X буфер для секвенирования, прямой или обратный праймер, бидистиллированная вода.

## **2. Методика сканирования фрагментов ДНК**

### ***Проведение ПЦР***

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1хПЦР буфер, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пМ праймеров и 1 единицу активности Taq полимеразы.

2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.

3. Пробирки поместить в амплификатор и задать температурно-временные условия в соответствии с целью исследования.

4. После окончания ПЦР пробы поместить в холодильник.

### ***Проведение денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (дВЭЖХ)***

#### *Приготовление буферных растворов*

Буфер А (рН = 7,0): триэтиламин — 14 мл, Na<sub>2</sub>EDTA — 0,037 г (Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O — 0,041 г), добавить 800 мл б/д воды, рН довести ледяной уксусной кислотой, довести до 1 л бидистиллированной водой.

Буфер В (рН = 7,0): триэтиламин — 14 мл, Na<sub>2</sub>EDTA — 0,037 г (Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O — 0,041 г), добавить 600 мл бидистиллированной воды, рН довести ледяной уксусной кислотой, ацетонитрил — 250 мл, довести до 1 л бидистиллированной водой.

#### *Подготовка образцов для анализа методом дВЭЖХ*

Выполнить денатурацию и отжиг продуктов ПЦР при следующих температурно-временных условиях — нагрев до 95°C (1 мин), постепенное охлаждение со скоростью 1°C/мин до 60°C (30 мин).

#### *Определение оптимальной температуры нагрева колонки*

Температура нагрева колонки является основным параметром, определяющим чувствительность метода. Она рассчитывается предварительно для каждого анализируемого фрагмента и зависит от его размера и процентного соотношения нуклеотидов. Для этого необходимо проанализировать зависимость времени элюирования молекул ДНК с колонки от температуры нагрева в диапазоне 50–64°C. Наилучшей температурой является та, при которой время элюирования образца с колонки минимальное. Полученные температурно-временные закономерности движения образцов позволяют подбирать оптимальную температуру денатурации гетеродуплексов для повышения разрешающей способности метода.

#### *Выполнение хроматографического анализа*

Подготовку оборудования к работе выполнить в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Провести хроматографическое разделение полученной смеси на специальной колонке при следующих параметрах:

- скорость буферного потока 0,45 мл/мин;
- температура колонки 50–64°C (подбирается опытным путем и зависит от длины фрагмента и процентного содержания G/C нуклеотидов);
- объем тестируемой пробы от 5 до 8 мкл на один анализ (зависит от концентрации ПЦР-продукта);

- время разделения 8 мин;
- изменение градиента концентрации буферных растворов и скорости потока по времени выполнения анализа, указанных в таблице.

Время, мин	Концентрация буфера А, %	Концентрация буфера В, %	Скорость потока, мл/мин
0:00	55	45	0,45
0:30	50	50	0,45
6:00	32	68	0,45
7:00	32	68	0,45
7:01	55	45	0,45

### ***Проведение секвенирования***

В пробирки для ПЦР внести по 4 мкл секвенирующей смеси, 2 мкл секвенирующего буфера, 2 пмоль прямого или обратного праймера, 4 мкл предварительно очищенного ПЦР-продукта и бидистиллированной воды до 20 мкл.

Пробирки поместить в амплификатор и провести 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 10 с денатурации при 96°C, 4 мин отжига и синтеза при 60°C.

Провести очистку полученного продукта секвенирующей реакции.

Подготовку к работе генетического анализатора выполнить в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

#### *Подготовка проб:*

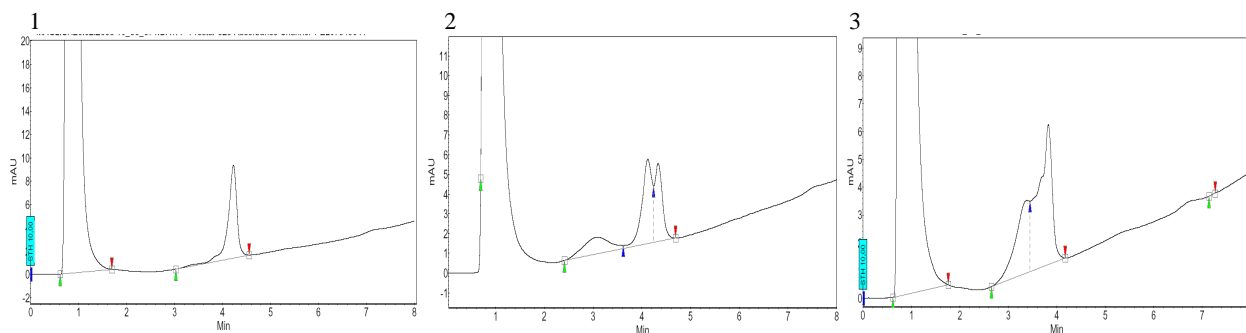
1. В пробирку с высушенным продуктом секвенирующей реакции добавить 15 мкл формамида.
2. Встряхивать на вортексе до полного растворения.
3. Пробы денатурировать 2 мин при 95°C.
4. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить во льду.
5. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.
6. Перенести весь объем пробы в микропробирки.

#### *Анализ проб:*

1. Установить штатив в анализатор.
2. Задать необходимые параметры анализа в программе сбора данных.
3. Запустить программу сбора данных.
4. После окончания разделения образцов и сбора данных перенести результаты в программу анализа данных.
5. Проанализировать полученные данные.

### ***Интерпретация полученных данных***

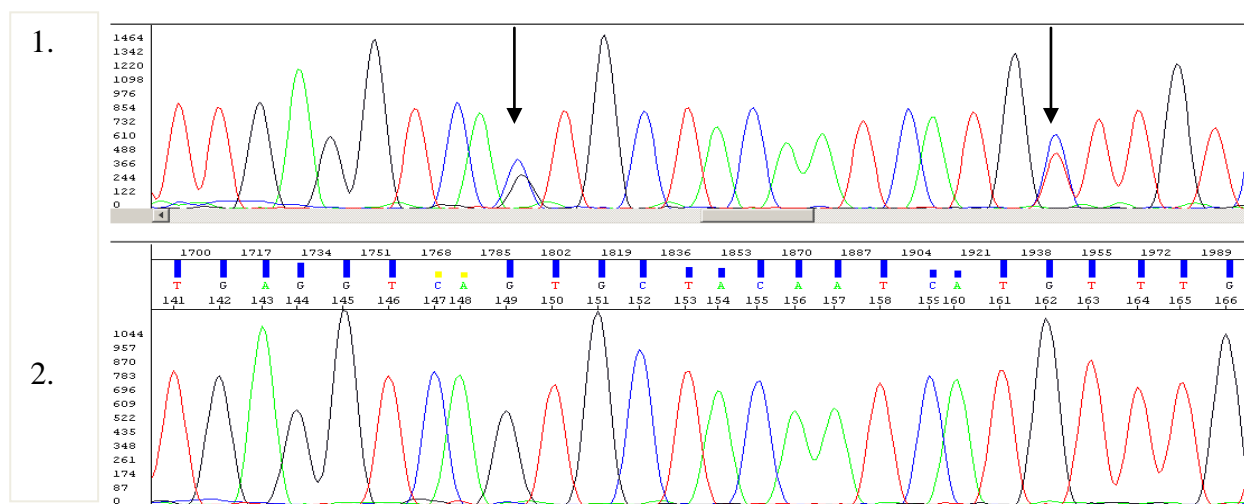
При выполнении денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии изменения в нуклеотидной последовательности определяют по присутствию дополнительных пиков на хроматограмме или изменению ее профиля, как показано на рисунке 1.



1 — нормальный образец; 2, 3 — образцы с измененным профилем хроматограммы

**Рисунок 1 — Хроматограммы, полученные при выполнении дВЭЖХ-анализа продуктов ПЦР**

При секвенировании идентификации мутаций и полиморфизмов проводят, исходя из зафиксированных изменений в последовательности нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК, как показано на рисунке 2.



1 — мутация IVS2+5G>C и IVS2+19T>C в гетерозиготном состоянии; 2 — нормальная последовательность нуклеотидов

**Рисунок 2 — Результаты секвенирования нуклеотидной последовательности 2 экзона гена ФАГ**

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

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Для предотвращения диагностических ошибок надо соблюдать следующие правила:

- использовать только химически чистую и желательнo стерильную посуду;
- использовать одноразовые пробирки и наконечники для пипеток;

- стерилизовать применяемые растворы (если допустима их стерилизация) и хранить их разлитыми небольшими порциями;
- работать только с минимально необходимыми объемами растворов;
- перед открыванием крышек пробирок осаждают растворы со стенок центрифугированием;
- в каждую серию проб включать отрицательный контроль;
- при выделении ДНК и постановке ПЦР работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.