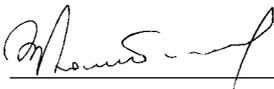


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

6 августа 2004 г.

Регистрационный № 174–1203

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА ВНЕЗАПНОЙ  
МЛАДЕНЧЕСКОЙ СМЕРТИ**

Инструкция по применению

*Учреждение-разработчик:* НИИ наследственных и врожденных заболеваний

*Автор:* А.А. Спектор

## **ВВЕДЕНИЕ**

Синдром внезапной смерти новорожденных (SIDS) составляет до 50% всех случаев младенческой смертности в развитых странах и является генетически гетерогенным состоянием. Значительную роль в этиологии SIDS играют болезни обмена и связанные с ними мутации соответствующих генов.

Одним из таких кандидатных генов является ген ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот со средней длины цепи (MCAD), который находится на хромосоме 1p31. Показано, что MCAD-недостаточность наиболее часто проявляется как гипокетонная гипогликемия в первые два года жизни. В гене MCAD были выявлены более пятидесяти мутаций, наиболее частой из которых является мутация A985G 11-го экзона.

Другим геном, вклад которого в SIDS может быть значительным, является ген 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот с длинной цепью (LCHAD), локализованный на хромосоме 7. Наиболее частой мутацией гена LCHAD является мутация G1528C, локализованная в 15-м экзоне и охватывающая 70% всех известных мутаций этого гена. LCHAD-недостаточность является аутосомно-рецессивным заболеванием, характеризующимся скелетной миопатией, Рейе-подобным синдромом и в некоторых случаях приводит к внезапной смерти новорожденных. Следует отметить, что при данном заболевании отмечаются кардиомиопатия и метаболические кризы, а также дефекты функционирования дыхательной цепи.

*Цель применения метода:* метод направлен на раннее выявление пациентов группы риска по SIDS с целью своевременного лечения, а также для медико-генетического консультирования семей пациентов.

Данная инструкция предназначена для врачей-лаборантов (молекулярных генетиков) медико-генетических центров.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Исследования патолого-анатомического материала от детей, которым посмертно выставлен диагноз «Синдром внезапной смерти».

2. Исследования патолого-анатомического материала от детей, умерших скоропостижно на фоне сердечно-сосудистого заболева-

ния или заболевания органов дыхания.

3. Прижизненные исследования при коматозных состояниях и частых потерях сознания, вызванных гипогликемией у детей.

4. Исследования при Рейе-подобном синдроме, характеризующемся энцефалопатией, нарушением обмена жирных кислот и органической ацидурией у детей.

### **Спектр исследований**

1. Выявление мутации A985G 11-го экзона гена MCAD.
2. Выявление мутации C1045T 11-го экзона гена MCAD.
3. Выявление мутации T1008A 11-го экзона гена MCAD.
4. Выявление мутации G1528C 15-го экзона гена LCHAD.

### **Биологический материал**

1. ДНК, выделенная из пятен крови, нанесенных на специальные бланки и обработанных стандартным методом (фиксация в метаноле и кипячение в течение 15 мин в 50 мкл воды). Размеры пятен варьируются от 1,5 до 6 мм в диаметре. Супернатант используется для амплификации.

2. ДНК, выделенная методом экстракции фенолом и хлороформом из лейкоцитов или (при посмертном исследовании) из тканей мышц, печени, легких или тимуса.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ**

*Необходимое оборудование:*

- амплификатор;
- аппарат для электрофореза в вертикальном геле;
- трансиллюминатор UV-25.

*Необходимые реактивы:*

- рестриктазы NcoI, MaeIII, TagI, PstI (Sigma);
- Taq-DNA-полимераза рекомбинантная (Gibco BRL);
- амплификационный буфер;
- 50 ммоль MgCl<sub>2</sub>;
- набор dNTP;
- борная кислота;
- ЭДТА;

- Трис;
- бромистый этидий;
- акриламид, бис-акриламид;
- праймеры для амплификации фрагментов 11-го экзона гена MCAD и 15-го экзона гена LCHAD (см. ниже);
- краситель для нанесения проб: 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола в 40% растворе сахарозы.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Идентификация мутаций 11-го экзона гена MCAD**

Для 11-го экзона описан ряд мутаций, наиболее частой из которых является мутация A985G. Для детекции мутаций используется полимеразная цепная реакция (ПЦР). Поскольку данная мутация не создает сайт рестрикции, то для амплификации используются праймеры, создающие сайты рестрикции для рестриктазы NcoI (StyI). Смысловый праймер создает сайт рестрикции для мутантной последовательности, а антисмысловый праймер создает второй сайт рестрикции, служащий внутренним контролем. После обработки рестриктазой продукт подвергается электрофорезу в 12% полиакриламидном геле. Фрагмент, несущий мутацию, должен иметь размер 160 пар оснований, фрагмент с нормальной последовательностью — 180 п. о.

Нуклеотидная последовательность праймеров следующая:

1. Смысловой праймер: 5'-TTTATGCTGGCTGAAATGGGCC-ATG-3', покрывает нуклеотиды 961–984, содержит замену С:Т в положении 981 и создает сайт рестрикции для NcoI при наличии мутации.

2. Антисмысловый праймер: 5'-CAGGATATCTGTATGAAATC-CATGGCCCTC-3', покрывает нуклеотиды 1130–1159, содержит замену G:А в положении 1135 и создает второй сайт рестрикции для NcoI, функционирующий в качестве внутреннего контроля рестрикции.

### ***Порядок действий***

1. Приготовление амплификационной смеси: в 20 мкл амплификационной смеси содержится 2 мкл 2 ммоль/л раствора dNTP, 2 мкл

десятикратного амплификационного буфера, 2,5 ммоль/л  $MgCl_2$  (1 мкл), праймеры по 5–10 пмоль на пробу, 2 U Taq-полимеразы.

2. Проведение амплификации: для амплификации берут 2 мкл водного раствора ДНК и 20 мкл ПЦР-смеси.

3. Параметры: денатурация без добавления полимеразы — 7 мин при  $96^\circ C$ . После добавления полимеразы — 35 циклов со следующими параметрами:

- денатурация — 1 мин при  $94^\circ C$ ;
- отжиг — 1 мин при  $61^\circ C$ ;
- полимеризация — 2 мин при  $74^\circ C$ .

После завершения амплификации продукт либо непосредственно подвергается рестрикции, либо хранится при температуре  $+4^\circ C$  (в том случае, если рестрикция должна проводиться через сутки) или  $-20^\circ C$  (при длительных сроках хранения).

4. Проведение рестрикции: для идентификации мутации A985G используется рестриктаза NcoI, которая добавлялась к 20 мкл амплификата в количестве 3 U на пробу. Для идентификации мутации C1045T, уничтожающей сайт рестрикции для рестриктазы TaqI, используется рестриктаза TaqI (5 U на пробу), а для идентификации мутации T1008A — рестриктаза MaeIII (3 U на пробу). Во всех случаях рестрикция проводится при  $37^\circ C$  в течение 18 ч.

### ***Идентификация рестрикционных фрагментов методом электрофореза в полиакриламидном геле***

1. Состав геля:

- 30% раствор акриламида и бис-акриламида (29 г акриламида, 1 г бис-акриламида довести водой до объема 100 мл);
- 3% раствор персульфата аммония (взвесить 300 мг персульфата аммония и долить дистиллированной водой до объема 10 мл);
- 2 мл Трис-боратного буфера (ТБЕ). Состав буфера (на 1 000 мл раствора) следующий: Трис — 121,1 г; борная кислота — 51,3 г; ЭДТА — 3,72 г; 20 мкл ТЕМЕД; 9,8 мл воды.

2. Приготовить краситель для нанесения проб. Данные о подвижности красителей в неденатурирующем полиакриламидном геле представлены в таблице.

### Подвижность красителей в неденатурирующем полиакриламидном геле

Полиакриламидный гель, %	Ксиленцианол	Бромфеноловый синий
20	45	12
15	60	15
12	70	20
8	160	45
5	260	65
3,5	460	100

Таким образом, в 12% геле движение полоски бромфенолового синего соответствует движению амплифицированного фрагмента длиной 20 п.о., а движение полоски ксиленцианола — движению амплифицированного фрагмента длиной 70 п.о.

3. Собрать стекла, закрепить их и залить гель.
4. Поместить в гель гребенку.
5. Подготовить пробы. Для этого в каждую пробу внести 1/6 объема красителя.
6. Подготовить аппарат для гель-электрофореза. Для этого в верхний и нижний резервуары залить однократный ТБЕ.
7. После полимеризации геля (20–25 мин при комнатной температуре) убрать гребенку, промыть образовавшиеся лунки и поместить гель в аппарат для гель-электрофореза. Удалить пузыри из нижней части стекол.

Электрофорез проходит при следующих параметрах: напряжение — 200–282 В, сила тока — 12–25 мА. Электрофорез считается завершенным, когда нижняя полоска красителя уходит в буфер.

Окраска геля проводится в растворе бромистого этидия (0,5 л однократного ТБЕ и 100 мкл раствора бромистого этидия).

#### *Интерпретация результатов*

Наличие двух фрагментов с размерами соответственно 180 и 160 п.о. позволяет сделать вывод о гетерозиготном носительстве мутации A985G 11-го экзона гена MCAD. Выявление одного фрагмента размером 160 п.о. (и фрагмента 20 п.о.) свидетельствует о гомозиготности по мутации A985G и позволяет сделать вывод о MCAD-недостаточности.

## **Идентификация мутации G1528C LCHAD**

Для этого также используется ПЦР с последующей рестрикцией PstI и электрофорезом в 12% полиакриламидном геле.

Нуклеотидная последовательность праймеров следующая:

1. Смысловый праймер: 5'-CCCTTGCCAGGTGATTTGGC-3'.

2. Антисмысловый праймер:

5'-GTATAGAAGCCAGGTCCATCCTGCCAAG-3'.

При амплификации с этими праймерами образуется ПЦР-продукт размером 640 п.о. В норме он содержит сайт для рестриктазы PstI. После рестрикции образуются два фрагмента размером 465 и 175 п.о. Данный сайт функционирует в качестве внутреннего контроля рестрикции. При наличии мутации G1528C образуется второй сайт рестрикции для PstI. После рестрикции амплифицированного фрагмента, содержащего мутацию, фрагмент длиной в 175 п.о. разрезается на два фрагмента длиной 117 и 58 п.о.

### ***Порядок действий***

1. Приготовление амплификационной смеси: в 20 мкл амплификационной смеси содержится 2 мкл 2 мМ/л раствора dNTP, 2 мкл 10-кратного амплификационного буфера, 2,5 мМ/л MgCl<sub>2</sub> (1 мкл), праймеры по 10 пмолей на пробу. Taq-полимераза — 2 U.

2. Проведение амплификации: Для амплификации берут 2 мкл водного раствора ДНК и 20 мкл ПЦР смеси.

3. Параметры амплификации: денатурация без добавления полимеразы — 5 мин при 96° С. После добавления полимеразы — 30 циклов со следующими параметрами:

– денатурация — 30 мин при 94° С;

– отжиг — 30 с при 55° С;

– полимеризация — 1 мин при 72° С;

– дополнительная полимеризация — 5 мин при 72° С.

4. Проведение рестрикции. Для рестрикции используется рестриктаза PstI в количестве 5 U на пробу. Рестрикция проводится при 37° С в течение 18 ч.

5. Идентификация рестрикционных фрагментов. Электрофорез проводится в 12% полиакриламидном геле (см. выше). Окраска осуществляется в растворе бромистого этидия. Фрагмент размером 175 п.о. говорит об отсутствии мутации.

### ***Интерпретация результатов***

Фрагменты размерами соответственно 175, 117 и 58 п.о. свидетельствуют о гетерозиготном носительстве мутации G1528C 15-го экзона гена LCHAD.

Отсутствие фрагмента размером 175 п.о. и наличие фрагментов размерами 117 и 58 п.о. свидетельствует о гомозиготности по данной мутации, что позволяет сделать вывод о LCHAD-недостаточности.