

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

«_____» _____ 2014 г.

Регистрационный № 200-1213

МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ
СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ,
ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ РАННИМ ПОРАЖЕНИЕМ
СЕРДЦА И СОСУДОВ (МУКОПОЛИСАХАРИДОЗЫ I, II,
VI ТИПОВ, СИНДРОМ МАРФАНА)

инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

Авторы:

к.м.н. Наумчик И.В., к.б.н. Гусина Н.Б., к.м.н Гусина А.А.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

06.03.2014

Регистрационный № 200-1213

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ
СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ,
ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ РАННИМ ПОРАЖЕНИЕМ
СЕРДЦА И СОСУДОВ (МУКОПОЛИСАХАРИДОЗЫ I, II,
VI ТИПОВ, СИНДРОМ МАРФАНА)**

инструкция по применению

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

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

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью создания эффективной системы диагностики наследственных системных заболеваний соединительной ткани, характеризующихся ранним поражением сердца и сосудов (мукополисахаридозы I, II, VI типов, синдром Марфана).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-генетиков медико-генетических центров, врачей-педиатров и врачей-кардиологов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Оборудование и реагенты для выделения ДНК.
2. Оборудование и реагенты для выполнения полимеразной цепной реакции (ПЦР).
3. Оборудование и реагенты для выполнения рестрикции и электрофоретического разделения рестрикционных фрагментов.
4. Оборудование и реагенты для проведения мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA).
5. Оборудование и реагенты для анализа конформационного полиморфизма одиночных цепей ДНК (SSCP).
6. Оборудование и реагенты для секвенирования по Сенгеру.
7. Оборудование и реагенты для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (ТМС).
8. Оборудование и реагенты для проведения флуоресцентной иммуноцитохимии.
9. Аппаратное и программное обеспечение для анализа и документации полученных результатов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Клинические признаки наследственного заболевания соединительной ткани (мукополисахаридоз I, II, VI типов, синдром Марфана).
2. Прогноз заболевания у пациентов с установленным диагнозом «мукополисахаридоз I, II, VI типов».
3. Выявление носительства мутаций в генах α -идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, арилсульфатазы В и фибриллина 1 у членов семьи пациентов с мукополисахаридозом I, II, VI типов, синдромом Марфана.
4. Пренатальная диагностика в семьях повышенного риска по мукополисахаридозу I, II, VI типов и синдрому Марфана.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Материал для исследования:

- для молекулярно-генетических исследований: ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, фибробластов, ворсин хориона, культивируемых амниоцитов, образцов тканей;

- для иммуноцитохимического исследования: культивируемые фибробласты;

- для высоко эффективной жидкостной хроматографии: моча.

Алгоритм комплексной диагностики наследственных заболеваний соединительной ткани

1. Этап селективного скрининга, представленный биохимическими тестами для выявления мукополисахаридозов, молекулярно-генетическими скринирующими тестами (MLPA, SSCP) для синдрома Марфана.

2. Этап диагностики, представленный энзимологическими и ДНК-исследованиями для мукополисахаридозов, секвенированием гена фибриллина 1 для синдрома Марфана.

3. Этап подтверждающей диагностики, представленный современными биохимическими технологиями для мукополисахаридозов, биохимическими и флуоресцентными иммуногистохимическими исследованиями для синдрома Марфана.

Этапы комплексной диагностики мукополисахаридозов I, II, VI типа

1. Предположительный диагноз — мукополисахаридоз I, II, VI типа.

1.1. Этап селективного скрининга: выполнить полуколичественное определение экскреции гликозаминогликанов в моче. По результатам скринирующего теста разделить пациентов на две группы:

а) группа пациентов с нормальной экскрецией гликозаминогликанов. В этой группе диагноз мукополисахаридоза I, II, VI типов исключается;

б) группа пациентов с повышенной экскрецией гликозаминогликанов. В этой группе выполнить количественное определение экскреции гликозаминогликанов, определить характер экскреции методом двумерного электрофореза.

1.2. Этап собственно диагностики: при аномальном характере гиперэкскреции гликозаминогликанов провести типирование мукополисахаридоза энзиматическими методами (определить активность α -идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, арилсульфатазы В в лейкоцитах и плазме крови или культивируемых фибробластах кожи). Определить наличие мажорных мутаций генов α -идуронидазы и арилсульфатазы В. Провести секвенирование гена идуронат-2-сульфатазы, а также генов α -идуронидазы, арилсульфатазы В, если мажорные мутации в них не выявлены.

1.3. Этап подтверждающей диагностики: пациентам с мукополисахаридозами I, II типов провести эффективную жидкостную хроматографию с целью прогнозирования развития неврологических осложнений.

2. Предположительный диагноз — синдром Марфана.

2.1. Этап скрининга: выполнить молекулярно-генетический скринирующий тест (MLPA, SSCP) с целью выявления крупных перестроек и точечных мутаций в гене фибриллина 1. По результатам теста разделить пациентов на три группы:

а) пациенты с нормальными результатами молекулярно-генетического скринирующего теста. Диагноз синдрома Марфана не исключают;

б) группа пациентов с крупными повреждениями гена фибриллина 1. Диагноз синдрома Марфана подтверждается;

в) группа пациентов с аномалиями конформационного полиморфизма одиночных цепей ДНК. В этой группе проводится следующий этап исследования для диагностики синдрома Марфана.

2.2. Этап собственно диагностики: при аномальном конформационном полиморфизме одиночных цепей ДНК провести секвенирование гена фибриллина 1. При выявлении патогенных мутаций диагноз подтверждается.

2.3. Этап подтверждающей диагностики: пациентам с подтвержденным диагнозом синдрома Марфана выполнить иммунохимическое исследование с целью получения информации о количестве фибриллина 1 и организации микрофибрилл в образцах тканей и культуре клеток.

Протокол выполнения МЛРА (получение МЛРА-продуктов)

1. Денатурация ДНК (день 1):

1.1. В пробирки внести по 5 мкл раствора, содержащего 50–100 нг ДНК (10–20 нг/мкл).

1.2. Пробирки поместить в термоциклер и включить МЛРА-программу (п. 4.7) для денатурации образцов (5 мин при 98°C, затем охладить до 25°C).

2. Гибридизационная реакция (день 1):

2.1. Приготовить гибридизационную смесь, смешав 1,5 мкл МЛРА-буфера и 1,5 мкл смеси олигонуклеотидных проб для каждого анализируемого образца ДНК, хорошо перемешать.

2.2. После того как температура в амплификаторе достигнет 25°C добавить по 3 мкл гибридизационной смеси в каждую пробирку, содержащую образец денатурированной ДНК, перемешать пипетированием.

2.3. Продолжить программу термоциклера (инкубация 1 мин при 95°C, затем 16–20 ч при 60°C).

3. Лигазная реакция (день 2):

3.1. Приготовить лигазную смесь, содержащую 3 мкл лигазного буфера А, 3 мкл лигазного буфера В и 25 мкл dH₂O (для одной пробы), перемешать.

3.2. Добавить 1 мкл лигазы 65 (для одной пробы) в лигазную смесь, перемешать пипетированием.

3.3. Продолжить программу термоциклера (пауза при t = 54°C).

3.4. Добавить 32 мкл лигазной смеси в каждую пробирку при t = 54°C, осторожно перемешать пипетированием;

3.5. Продолжить программу термоциклера: инкубация — 15 мин при 54° С (для лигирования), 5 мин при 98°C (для инактивации лигазы), затем следует пауза при t = 15°C. Продукты лигазной реакции можно хранить при 4°C в течение 1 недели. Для более длительного хранения использовать температуру -20°C. Хранить в темноте.

4. ПЦР-реакция (день 2):

4.1. Приготовить пробирки для ПЦР-реакции.

4.2. Приготовить буферную смесь, состоящую из 4 мкл SALSA ПЦР-буфера и 26 мкл dH₂O (на одну пробу), перемешать.

4.3. Добавить по 30 мкл буферной смеси в каждую пробирку.

4.4. При комнатной температуре добавить по 10 мкл лигазного продукта в соответствующую пробирку с буферной смесью.

4.5. Приготовить полимеразную смесь, состоящую из 2 мкл SALSA ПЦР-праймеров, 2 мкл SALSA буфера для разведения энзима, 5,5 мкл dH₂O и 0,5 мкл SALSA полимеразы (на каждую пробу), перемешать пипетированием и поместить на лед до использования.

4.6. Продолжить программу термоциклера: пауза при 60°C, затем пробирки помещают в прибор.

4.7. Добавить по 10 мкл полимеразной смеси к каждой пробе при 60°C, мягко перемешать пипетированием и немедленно продолжить программу термоциклера — 35 циклов (30 с при 95°C, 30 с при 60°C, 1 мин при 72°C, 20 мин при 72°C, затем пауза при 15°C).

Ниже приведена обобщённая программа термоциклера, необходимая для получения MLPA-продуктов.

Денатурация ДНК: 1) 98°C — 5 мин; 2) 25°C — пауза.

Гибридизационная реакция: 3) 95°C — 1 мин; 4) 60°C — пауза.

Лигазная реакция: 5) 54°C — пауза; 6) 54°C — 15 мин; 7) 98°C — 5 мин; 8) 15°C — пауза.

ПЦР-реакция: 9) 60°C — пауза; 35 циклов: 95°C — 30 с; 60°C — 30 с; 72°C — 60 с; 10) 72°C — 20 мин; 11) 15°C — пауза.

Фрагментный анализ MLPA-продуктов на генетическом анализаторе ABI-Prism 310

1. Приготовить образцы для нанесения на капилляр, смешав 1,0 мкл MLPA-продуктов, 0,5 мкл меченых стандартов молекулярных весов и 8,5 мкл формамида (HiDi).

2. Проинкубировать полученную смесь 5 мин при 95°C.

3. Нанести смесь на прибор. Начальные параметры — 1,6 кВ, время нанесения 15 с, фильтр D, полимер POP4.

Рекомендуемый капилляр — 47 см.

Анализ данных

1. Визуально оценить качество паттерна пиков, наличие, величину сигнала и длину контрольных пиков.

2. Провести компьютерный анализ данных с помощью программы Coffalyser:

2.1. Провести intra-sample нормализацию для каждого продукта амплификации в образце;

2.2. Провести inter-sample нормализацию для каждого продукта амплификации в образце (количественное соотношение фрагментов).

Интерпретация результатов

Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов <0,7 указывает на наличие гетерозиготной делеции соответствующего экзона, соотношение >1,3 — на наличие дубликации.

Протокол выполнения SSCP

1. Амплификация генов α -идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, арилсульфатазы В и фибриллина 1.

Для амплификации экзонов генов α -идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, арилсульфатазы В и фибриллина 1 использовать пары праймеров, представленные в приложении.

Составить общую реакционную смесь: амплификационный буфер (1x), смесь дНТФ 2 мкМ каждого, 1,5–2,5 мМ $MgCl_2$, 5 пМ каждого праймера, 2 ед. Таq-полимеразы. Реакционный объем на 1 реакцию — 25 мкл: 23 мкл реакционной смеси и 2 мкл исследуемой ДНК.

Программа амплификации: первичная денатурация при температуре 95°C в течение 4 мин, далее 30 циклов амплификации (денатурация при 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров при T_{amp} в течение 30 с, элонгация при 72°C в течение 30 с, конечная элонгация при температуре 72°C в течение 5 мин.

2. Денатурация: в амплификационную пробирку объемом 0,2 мл внести 2 мкл амплификата и 4 мкл формамида. Полученную смесь нагреть в течение 5 мин при 95°C, затем быстро охладить.

3. Электрофорез: приготовить 10%-й полиакриламидный гель, используя 30%-ю смесь мономеров акриламида и метиленбисакриламида в соотношении 39:1. Гель изготавливают следующим образом: смешивают 19,4 мл бидистиллированной воды, 11,7 мл 30%-й смеси мономеров акриламида и метиленбисакриламида в соотношении 39:1, 1,75 мл ТВЕ 10x, 2 мл 87%-го глицерина, 100 мкл 20% APS, 40 мкл ТЕМЭД. Для электрофореза используют вертикальную электрофорезную систему. Электрофорез выполняют в ТВЕ 0,5x при напряжении 135 В и силе тока 19А. Для визуализации результатов гель после электрофореза помещают на 10–30 мин в краситель Sybr Gold (Invitrogen), после чего его рассматривают в проходящем УФ-свете.

Протокол секвенирования генов

Перед проведением терминирующей реакции с мечеными дидезоксинуклеотидтрифосфатами необходимо провести очистку амплификата с использованием преципитации с этанолом.

Очистка амплификата методом преципитации с этанолом:

- к постамплификационной смеси добавить 2 мкл 3 М ацетата Na и 50 мкл 95% этанола;

- инкубировать 15 мин при комнатной температуре;

- центрифугировать 20 мин при 15 000 об./мин;

- удалить супернатант и добавить 250 мкл 70% этанола;

- центрифугировать 5 мин при 15 000 об./мин;

- удалить супернатант и высушить образец в течение 1 мин при температуре 90°C;

- к высушенному осадку добавить 25 мкл ТЕ буфера.

Терминирующую реакцию необходимо проводить в автоматическом амплификаторе «Perkin-Elmer» или «Applied Biosystems». Используют коммерческий набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit «Applied Biosystems». Реакционная смесь включает 4 мкл исследуемого амплификата, амплификационный буфер BigDye Terminator Sequencing Buffer (5x) — 2 мкл, реакционную смесь BigDye Terminator Master Mix («Applied Biosystems») —

4 мкл, 10 мкМ каждого праймера, бидистиллированную воду до конечного объема 20 мкл.

Программа амплификации включает 24 цикла со следующими параметрами: денатурация при 94°C в течение 10 с, отжиг праймеров при 50°C в течение 5 с, элонгация при 60°C в течение 4 мин.

Для удаления несвязанных дидезоксинуклеотидтрифосфатов после амплификации необходимо провести очистку постаmplификационной смеси методом преципитации с этанолом.

Далее проводят электрофоретическое разделение продуктов терминирующих реакций. Перед электрофорезом высушенные после предшествующего этапа очистки образцы растворяют в 20 мкл формамида, инкубируют 5 мин при 95°C и переносят пробы на лед до электрофоретического разделения.

Полученные в реакции секвенирования флуоресцентно меченые одноцепочечные фрагменты ДНК делят с помощью капиллярного электрофореза на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 «Applied Biosystems».

Протокол определения мажорных мутаций гена α -идуронидазы

1. Амплификация

Для ПЦР использовать 1 мкл препарата ДНК.

Составить общую реакционную смесь: амплификационный буфер (1x), смесь дезоксирибонуклеотидов 0,2 мМ каждого, 1,5 мМ MgCl₂, 10% DMSO, 10 пмоль каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакционный объем на 1 реакцию — 25 мкл: 24 мкл реакционной смеси и 1 мкл исследуемой ДНК.

Для ПЦР использовать следующие праймеры:

Мутация	Смысловый праймер	Антисмысловый праймер
W402X	tggggactccttcaccaaggggag	caagagccccagcgggcccagagac
Q70X	catgctgabgctcgggactgagccg	tctgggacgcccagaccctg

Амплификационная программа: начальная денатурация 94°C в течение 4 мин; 30 циклов со следующими параметрами — денатурация при t = 94°C в течение 40 с, отжиг праймеров при 62°C в течение 40 с, элонгация при 72°C в течение 30 с. Конечная элонгация при 72°C 10 мин.

2. Рестрикция

В пробирку объемом 0,2 мл добавить 10 мкл амплификата, 5 ЕД (1 мкл) рестриктазы MaeI и 1,6 мкл соответствующего 10x рестрикционного буфера. Общий объем довести до 20 мкл бидистиллированной водой. Пробирки поместить в термостат при 37°C на 16–18 ч.

Разделение рестрикционных фрагментов проводить с помощью электрофореза в 8%-м полиакриламидном геле.

Визуализацию результатов электрофоретического разделения рестрикционных фрагментов осуществлять в проходящем ультрафиолетовом свете после предварительной окраски геля бромистым этидием.

3. Интерпретация результатов

В результате амплификации участка гена α -идуронидазы, содержащего мутацию W402X, образуется фрагмент длиной 229 п.о. Мутация W402X создает

сайт рестрикции для рестриктазы MaeI, что сопровождается образованием фрагментов длиной 130 и 99 п.о.

В результате амплификации участка гена α -идуронидазы, содержащего мутацию Q70X, образуется фрагмент длиной 216 п.о. Мутация Q70X создает сайт рестрикции для рестриктазы MaeI, что сопровождается образованием фрагментов длиной 124 и 92 п.о.

Протокол определения мажорных мутаций гена идуронат-2-сульфатазы, арилсульфатазы В. Методика определения мутации R468* гена идуронат-2-сульфатазы

1. Амплификация

Для ПЦР использовать 1 мкл препарата ДНК.

Составить общую реакционную смесь: амплификационный буфер (1x), смесь дезоксирибонуклеотидов 0,2 мМ каждого, 1,5 мМ MgCl₂, 10% DMSO, 10 пмоль каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакционный объем на 1 реакцию — 25 мкл: 24 мкл реакционной смеси и 1 мкл исследуемой ДНК.

Для ПЦР использовать следующие праймеры:

Мутация	Смысловый праймер	Антисмысловый праймер
R468*	acctcgctgccccgttctt	gctggaagggagcacatcac

Амплификационная программа: начальная денатурация при 94°C в течение 4 мин, 30 циклов со следующими параметрами — денатурация при температуре 94°C в течение 40 с, отжиг праймеров при температуре 58°C в течение 40 с, элонгация при 72°C в течение 30 с. Конечная элонгация при 72°C 10 мин.

2. Рестрикция

В пробирку объемом 0,2 мл добавить 10 мкл амплификата, 5 ЕД рестриктазы MspI и соответствующий 1x рестрикционный буфер. Общий объем довести до 20 мкл H₂O. Пробирки поместить в термостат 37°C на 16–18 ч.

Разделение рестрикционных фрагментов проводить с помощью электрофореза в 8%-м полиакриламидном геле.

Визуализацию результатов электрофоретического разделения рестрикционных фрагментов осуществлять в проходящем ультрафиолетовом свете после предварительной окраски геля бромистым этидием.

3. Интерпретация результатов

В результате амплификации участка гена идуронат-2-сульфатазы, содержащего мутацию R468*, образуется фрагмент длиной 444 п.о. В отсутствие мутации при воздействии рестриктазы MspI образуются фрагменты длиной 269 и 135 п.о. Мутация R468* элиминирует сайт рестрикции для MspI.

Методика определения мутации R152W гена арилсульфатазы В

1. Амплификация

Для ПЦР использовать 1 мкл препарата ДНК.

Составить общую реакционную смесь: амплификационный буфер (1x), смесь дезоксирибонуклеотидов 0,2 мМ каждого, 1,5 мМ MgCl₂, 10% DMSO, 10 пмоль каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакционный объем на 1 реакцию — 25 мкл: 24 мкл реакционной смеси и 1 мкл исследуемой ДНК.

Для ПЦР использовать следующие праймеры:

Мутация	Смысловой праймер	Антисмысловой праймер
R152W	atztatgtttatctctgtaag	aaagaaacatgtgcattcc

Аmplификационная программа: начальная денатурация при 94°C в течение 4 мин, 30 циклов со следующими параметрами — денатурация при $t = 94^{\circ}\text{C}$ в течение 40 с, отжиг праймеров при температуре 54° С в течение 40 с, элонгация при 72° С в течение 30 с. Конечная элонгация при 72°C 10 мин.

2. Рестрикция

В пробирку объемом 0,5 мл добавить 10 мкл амплификата, 5 ЕД рестриктазы MspI и соответствующий 1x рестрикционный буфер. Общий объем довести до 20 мкл бидистиллированной водой. Пробирки поместить в термостат при 37°C на 16–18 ч.

Разделение рестрикционных фрагментов проводить с помощью электрофореза в 8%-м полиакриламидном геле.

Визуализацию результатов электрофоретического разделения рестрикционных фрагментов осуществлять в проходящем ультрафиолетовом свете после предварительной окраски геля бромистым этидием.

3. Интерпретация результатов

В результате амплификации участка гена арилсульфатазы В, содержащего мутацию R152W, образуется фрагмент длиной 232 п.о. В отсутствие мутации при воздействии рестриктазы MspI образуются фрагменты длиной 162 и 70 п.о. Мутация R152W элиминирует сайт рестрикции для MspI.

Протокол эффективной жидкостной хроматографии — ТМС

1. Контрольные и исследуемые образцы, калибраторы и 3 N раствор HCl в метаноле извлечь из холодильника и оставить на 30 мин до достижения комнатной температуры.

2. Промаркировать микроцентрифужные пробирки емкостью 1,5 мл, боросиликатные флаконы и стеклянные флаконы емкостью 2 мл.

3. Перенести 200 мкл образца мочи в микроцентрифужные пробирки емкостью 1,5 мл, центрифугировать 5 мин при комнатной температуре при 15,000 x g.

4. Перенести 25 мкл образца мочи в боросиликатный флакон.

5. Полностью высушить образцы мочи в токе азота при температуре 30°C в течение 30 мин.

6. Добавить 200 мкл 3 N раствор HCl в метаноле к каждому образцу мочи и закрыть флаконы крышками.

7. Инкубировать при температуре 65°C 75 мин.

8. Перенести флаконы в штатив и охладить образцы мочи до комнатной температуры в течение менее 5 мин.

9. Высушить образцы мочи в токе азота при температуре 30°C в течение 20–30 мин.

10. Добавить 200 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта к каждому образцу мочи.

11. Высушить образцы мочи в токе азота при температуре 30°C и растворить в 10 mM растворе ацетата аммония в ацетонитриле с водой в соотношении 90:10.

12. Перенести образцы мочи во флаконы для автосемплера — стеклянные флаконы емкостью 2 мл (12×32 мм) с крышками.

13. Запрограммировать условия высокоэффективной жидкостной хроматографии:

- колонка Acquity UPLC BEH Amide 1.7 μ m, 2.1×50 mm column;
- преколонка VanGuard BEH Amide 1.7 μ m guard column;
- мобильная фаза А: 10 mM раствор ацетата аммония смеси ацетонитрила с водой (90:10);

- мобильная фаза В: 10 mM раствор ацетата аммония смеси ацетонитрила с водой (10:90);

- температура колонки 30°C;

- линейный градиент — в соответствии с нижеприведенными параметрами:

Время	Скорость потока (мл/мин)	Фаза А (%)	Фаза В (%)
0	0,4	100	0
0,5	0,4	100	0
4,5	0,4	75	25
5,5	0,4	88	12
6,0	0,4	100	0

- время анализа — 6 мин.

14. Запрограммировать условия ТМС.

Параметры источника ионов: ионизация электрораспылением (electrospray ionization, ESI) должна происходить при положительном напряжении зонда 3,35 кВ.

Параметры ТМС: измерение проводить в режиме регистрации выбранных реакций (selected reaction monitoring, SRM) в соответствии с ниже приведенными параметрами:

Измеряемое вещество	Масса иона прекурсора (Да)	Масса иона продукта (Да)	Напряжение сопла (В)	Энергия столкновения (эВ)	Время (мин)
DiHS-NS	406	245	50	29	2,5–4
² H6-DiHS-NS	412	251	50	29	2,5–4
DiCS	426	236	20	9	0–2,5
² H6-DiCS	432	239	20	9	0–2,5
DiDS	426	236	20	9	0–2,5
² H6-DiDS	432	239	20	9	0–2,5

15. Выполнить высокоэффективную жидкостную хроматографию.

16. Проанализировать полученные данные с помощью программного обеспечения Analyst 1.4.

Протокол иммунохимического исследования

Иммунохимическое исследование проводится на культуре клеток следующим образом.

1. Удалить культуральную среду.
2. Культуру промыть 2 раза по 5 мин полифосфатным буфером.
3. Зафиксировать культуру ледяным ацетоном на льду. Время фиксации 10 с. После фиксации фиксатор удалить.
4. Промыть культуру холодным полифосфатным буфером 3 раза по 5 мин.
5. Добавить раствор детергента для проведения демаскирования антигенных детерминант (10–30 мин). При демаскировании необходимо контролировать морфологическую целостность культуры в световом микроскопе.
6. После окончания процедуры демаскирования промыть культуру полифосфатным буфером 3 раза по 5 мин.
7. Нанести блокирующий агент, инкубировать во влажной камере при температуре 37°C 30–60 мин.
8. Стряхнуть блокирующий агент.
9. Обработать культуру раствором первичных антител. Образец инкубировать с раствором первичных антител в течении 2–3 ч при комнатной температуре во влажной камере или 12 ч при $t = +4\text{--}+6^\circ\text{C}$.
10. После окончания инкубации исследуемый образец промыть полифосфатным буфером 3 раза по 5 мин.
11. Исследуемый образец инкубировать с раствором вторичных антител в течении 2–3 ч при комнатной температуре или 12 час при $t = +4\text{--}+6^\circ\text{C}$.
12. После окончания инкубации образец промыть полифосфатным буфером.
13. Нанести DAPI, инкубировать 1 мин в темной камере.
14. На флуоресцентном микроскопе визуально оценить флуоресценцию, локализация красителей должна соответствовать локализации определяемых антигенов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Ошибки, связанные с нарушением правил забора, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований. Для предупреждения ошибок этой группы необходимо тщательно соблюдать правила работы с биологическим материалом и инструкции по проведению лабораторных исследований.

2. Ошибки при выполнении собственно лабораторных исследований, связанные с несоблюдением протоколов исследований, использованием реагентов, утративших активность, загрязнением исследуемых образцов продуктами реакций и др. Для предупреждения таких ошибок необходимо соблюдать протоколы исследований, контролировать годность реагентов, использовать контрольные материалы и образцы.

3. Ошибки, связанные с неправильной интерпретацией полученных результатов. Для предупреждения ошибок в интерпретации результатов

лабораторных исследований необходимо обучение и повышение квалификации специалистов.

Приложение

Таблица 1 — Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации отдельных экзонов гена альфа-идуронидазы

Экзон	Праймер	Последовательность	Tann (°C)
1	Смысловой	ACCCAACCCCTCCCAC	64
	Антисмысловой	GCTCCGGTCTCTGAAGCT	
2	Смысловой	GGCTTGAACGTGTGTGTCAGCCGC	65
	Антисмысловой	GTAAGGGGCTCTGGGACGCCAGA	
3	Смысловой	AGGTCCTGCCTGGCTCCTGA	66
	Антисмысловой	GGCTGGGAGCAGAGCCCACA	
4	Смысловой	ACCCTCTCCCTACCCAG	64
	Антисмысловой	GCGTGATAGGGGTGCAAC	
5	Смысловой	CATCACCTTGCACCCTCC	64
	Антисмысловой	CGTCTACACCTGCCCTGG	
6	Смысловой	CCGCTCATCCCCAGGGCAGGTGTA	66
	Антисмысловой	ACAGCGGCTGAGGGCGCAGAACAC	
7	Смысловой	CGCGCTGACCCTGGTGGTGGTGA	68
	Антисмысловой	GCCGGGGGGCGCGCAGGGCGTT	
8	Смысловой	TTCTCCCGAGACGGGACAGGCGA	67
	Антисмысловой	TTCTCCCGAGACGGGACAGGCGA	
9	Смысловой	TGGGGACTCCTTCACCAAGGGGAG-	68
	Антисмысловой	CAGAGCCCCAGCGGGGCCAGAGAC	
10	Смысловой	GGTGACCCTGCGGCTG	61
	Антисмысловой	TCCTCAGGGTTCTCCAGG	
11	Смысловой	GTGTGGGTGGGAGGTGGAGCGGTG	65
	Антисмысловой	AGGGAAGGCCTGTGATGGCGTCGG	
12	Смысловой	GCAGGCAAGTGGCAGTCCC	68
	Антисмысловой	GGCAAGTGGCCCGAGTGAC	
13	Смысловой	GGGGCTTGAGGGAATGAG	62
	Антисмысловой	CCTGACCCCAGGCTTCTC	
14	Смысловой	CAGGGCAGTACTGGGTGG	62
	Антисмысловой	TATATTGCAAAGGGGGTGATG	

Таблица 2 — Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации отдельных экзонов гена идуронат-2-сульфатазы

Экзон	Праймер	Последовательность	Tann (°C)
1	Смысловой	TGTTGCGCAGTCTTCATGGGT	60
	Антисмысловой	GGAGAAGAGATGGCAGGGAG	
2	Смысловой	CAGTGTCAGTGCAGGTTACC	60
	Антисмысловой	TCAGTGCACGAAGCAGCACA	
3	Смысловой	CCTAAGAGATGGCAGACATG	60
	Антисмысловой	GAGAACCAGACTCTGGACATG	
4	Смысловой	CAAGGGATATCTTCTAACCA	60

	Антисмысловой	GGTTCCTCTTCAGAAATGTC	
5	Смысловой	CTGAGTGACTAACACGTGAA	60
	Антисмысловой	TCACAGCTGTGCTGGATCAG	
6	Смысловой	CAGTGATAGAGCCACAAGCT	60
	Антисмысловой	ACCTACGACACTATGTCATC	
7	Смысловой	TGTATGCCTTGGCAATTAA	60
	Антисмысловой	CATGTTTCACAGGAAAGTTC	
8	Смысловой	CAAGCTGTGGTATGATGATT	60
	Антисмысловой	CTAAAGGTGATCTTACTGTC	
9	Смысловой	GCAGGCTTTTATAATGTAAC	60
	Антисмысловой	CGACCAGCTCTAACTCCTCC	

Таблица 3 — Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации отдельных экзонов гена арилсульфатазы В

Экзон	Праймер	Последовательность	Tann (°C)
1	Смысловой	TCCTCATTCSTATCAGCGGTACAAG	65
	Антисмысловой	GAGAAGCCGCCGGGACCCATAACT	
2	Смысловой	ATTTTATGTTTATCTCTGTAAG	50
	Антисмысловой	AAAGAAACATGTGCATTTCC	
3	Смысловой	TGCTTCCATTCTTGC	50
	Антисмысловой	GТАААТАGАAGCAAAACTT	
4	Смысловой	CCTTCTATATTTAATGCTTCAATATC C	60
	Антисмысловой	CTAGCTTTGCCAAGAGATGATTTTCC	
5	Смысловой	CATCATCCTCATGCC	50
	Антисмысловой	GAAAAGGGCAGGGTGT	
6	Смысловой	GCGCGAATTCCCTTAAAAATTGTTTT CC	50
	Антисмысловой	TAGCAATGCACTGGTACTC	
7	Смысловой	TCAAACТАТТТCTFCC	65
	Антисмысловой	TFGCTAAGCTAAGGACTCT	
8	Смысловой	GCGCGAATTCTGCTCAGTAAACTGT	65
	Антисмысловой	GAAAAGGCCTGAGGTCCAACCTCC	

Таблица 4 — Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации отдельных экзонов гена фибриллина 1

Экзон	Праймер	Последовательность	Tann (°C)
1	Смысловой	GCAAGAGGGCGGGGAG	58
	Антисмысловой	TGAAACTTGGGAGACCCAC	
2	Смысловой	TCTGCCAGGATTCATCTTGC	58
	Антисмысловой	CAACACAACAAAAGAAGGAC	
3	Смысловой	TCGTGTTCCAATCCATGTG	58
	Антисмысловой	TGGGTATAACCACATAAAATAAT	
4	Смысловой	AACTCCTGTGAGCTGTTGC	58

	Антисмысловой	GCTGTGTCCCAGGTAATCG	
5	Смысловой	TCAGGTAAAGCGTCTCAGC	58
	Антисмысловой	ATCCCGGGTACCAGCATG	
6	Смысловой	TCTGCATGATGGTTCCTGC	58
	Антисмысловой	CCAGAGCAAATAAGATTAATCC	
7	Смысловой	TCTGCAATGAATTTTCATATGAG	56
	Антисмысловой	ACTACACCCCCCAACTGC	
8	Смысловой	ACTGACGAATGGTTTTATATTG	58
	Антисмысловой	GCAAGAGGGCGGCGGGAG	
9	Смысловой	TGAAACTTGGGAGACCCAC	58
	Антисмысловой	TCTGCCAGGATTCATCTTGC	
10	Смысловой	CAACACAACAAAAGAAGGAC	58
	Антисмысловой	TCGTGTTCCAAATCCATGTG	
11	Смысловой	TGGGTATAACCACATAAAATAAT	58
	Антисмысловой	AACTCCTGTGAGCTGTTGC	
12	Смысловой	GCTGTGTCCCAGGTAATCG	58
	Антисмысловой	TCAGGTAAAGCGTCTCAGC	
13	Смысловой	ATCCCGGGTACCAGCATG	56
	Антисмысловой	TCTGCATGATGGTTCCTGC	
14	Смысловой	CCAGAGCAAATAAGATTAATCC	58
	Антисмысловой	TCTGCAATGAATTTTCATATGAG	
15	Смысловой	ACTACACCCCCCAACTGC	58
	Антисмысловой	ACTGACGAATGGTTTTATATTG	
16	Смысловой	CTCATCTGTTTGAAGTGACAG	58
	Антисмысловой	GGTGGCAGAAGGCTGGC	
17	Смысловой	GATCTACCTGTTCTGCAAAC	58
	Антисмысловой	GTAATTTTGAAAGGAATCCTTA	
18	Смысловой	TCAGAATATCCTTACAGTGAG	58
	Антисмысловой	TCTAAGCTACTCAAAGGCAG	
19	Смысловой	AAAGTTTGGGCCCTTTTAAAG	58
	Антисмысловой	ATAGCAAAGTACACAGTATAAG	
20	Смысловой	CCCAGACTAGATTTTAGCAG	58
	Антисмысловой	TAAAGTATAACAACATTGATAAAC	
21	Смысловой	GTGTATGTTTGAATTTTATATAG	58
	Антисмысловой	CTCATGTGAGCCTAGATAAATG	
22	Смысловой	CTACTTCATGCTCCAGGTC	58
	Антисмысловой	CTGTTCCGTTTTGTAGTTCTC	
23	Смысловой	GTTTTATGAACTTACCAGGTTT	58
	Антисмысловой	ACCGAAGCTAAGTGCTCAG	
24	Смысловой	CAGCAAATTATTTATGTGTGCAG	58
	Антисмысловой	ATCAAGTAGAGTGCTGAGATC	
25	Смысловой	CAAGAACTTCCAACCTTCATG	58
	Антисмысловой	TAAAGGACGTCCCCTCTC	

26	Смысловой	AATTAAGGCTGTCCTGAGAC	58
	Антисмысловой	CATGGAATCCTTCTCTTTCTG	
27	Смысловой	GGCCCCACCTTAAACATG	58
	Антисмысловой	GAAAGTCTTTGCTCCTTAC	
28	Смысловой	TGCCAAAGTTGGAAGCTTATG	58
	Антисмысловой	TAACATAACATAACATAAAATAAAG	
29	Смысловой	CAGACATCCAAACCATATCAG	58
	Антисмысловой	GAACCTACTGAGAGATTCAAC	
30	Смысловой	AATAGTCTTATGCTAGTAGGC	58
	Антисмысловой	ACAGTGCTTATGACTAACAAG	
31	Смысловой	GТАCTCAATGATATCAAATAGC	58
	Антисмысловой	ACCAATCTCTTAACTACTTAATA	
32	Смысловой	CCAAAAGACATTTGTGCTGAG	58
	Антисмысловой	GTGTAATCTATGCAGTCCTTG	
33	Смысловой	GGTTTTAAATACCACCCTTTC	58
	Антисмысловой	CTGGCTTCTCTGACTAGTG	
34	Смысловой	CGAGGAAGAGTAACGTGTG	58
	Антисмысловой	TCAAGCCCAGCAAGGCTC	
35	Смысловой	AGTTTTTGCTTTTTCTCCCTC	58
	Антисмысловой	CGGGACACCAGGGAGCTG	
36	Смысловой	GAGATAACTCCACTACTCAC	58
	Антисмысловой	AATACACAGTATGCTTGCTTC	
37	Смысловой	GTAGAAAGATTCTGCCTGATG	58
	Антисмысловой	GAACTGGCTGGAGTTGAAAT	
38	Смысловой	AAACTTTAGATTCAAACAACCTC	58
	Антисмысловой	TCAAGTTGTGTGTGCTTTAAG	
39	Смысловой	ATTTACAATGCTAAAGGAATGC	58
	Антисмысловой	TCAGTTCTTGATATCTGCAAG	
40	Смысловой	AAATGTGAAGTTTTCATATTCAC	58
	Антисмысловой	CATGCATTACTGAGAAAAGCT	
41	Смысловой	GCTTGTTGAGTATCCACTTAG	58
	Антисмысловой	GCTTCCTTCGCTAAGACTG	
42	Смысловой	TATCCTCCGGTCCCACCT	58
	Антисмысловой	AACCAGAAAGTTCTGACAATG	
43	Смысловой	TGTCCTGTCACTCATGAATG	58
	Антисмысловой	CTCTTTTCTGGATATGATAAAG	
44	Смысловой	CTGTTCTCCTTCAAATTCAGT	58
	Антисмысловой	GTAGGCATGTCCAGCCTG	
45	Смысловой	GAGCTAGGATTA CTCTGAG	58
	Антисмысловой	CTGCTGCATATCTGTCTGTG	
46	Смысловой	AAGTTCTCAGCCTATGGATG	58
	Антисмысловой	TGGTTCACTAGAGATGATGC	
47	Смысловой	GACATCTTTGGAATATATTAAG	58

	Антисмысловой	CCAGGTCTTTCTAAGTCCTG	
48	Смысловой	GATGGAAGTCATGCCAGTG	58
	Антисмысловой	GGACACCCGCACTCCTC	
49	Смысловой	TGATGTCTCCATCGTGTTTG	58
	Антисмысловой	AGACCACCACAAATAAACATG	
50	Смысловой	ACGGACTCAGTAGGAAAGC	58
	Антисмысловой	CAGTCTGCACCCTGCATG	
51	Смысловой	AGCTTGTAATGAATTGCTATTG	58
	Антисмысловой	AAGCAGATTGAGAATACTGAG	
52	Смысловой	TTGTCCCTTCATTTAGATAGC	58
	Антисмысловой	CCTGATGGTGACTCACTAG	
53	Смысловой	CTCAATTCATCATGTTTTGGAC	58
	Антисмысловой	CCATCAGGCCTAGATGATC	
54	Смысловой	CTTTGTTGCTGTCCATGATC	58
	Антисмысловой	CTCACAGATAAAGCTTCCTG	
55	Смысловой	GCAGATATATGCATTTTCTTTG	58
	Антисмысловой	GTCCACTGTCACCTTCTGATG	
56	Смысловой	TGGTCAGATGACTCTTCTTG	58
	Антисмысловой	GTGTGGAGGCTGAGGTTAG	
57	Смысловой	ATTTCCCTGACATCCCCTTTG	58
	Антисмысловой	CAAATAAATAGATTCCCTGTAAG	
58	Смысловой	CACTGAAGTGACCCCCTAC	58
	Антисмысловой	AATTTCCACTTGAGGATAAGC	
59	Смысловой	GCGTGTACACATCATTTTTAG	58
	Антисмысловой	ATGTGTCAGGAGCTAGGTG	
60	Смысловой	ATCCTGTTTTGTTGGCTGAC	58
	Антисмысловой	GAATCGCTACAATCCATGTAG	
61	Смысловой	GTATGTGTGAGCACACCTG	58
	Антисмысловой	CTCCACAAGGATTCACCAG	
62	Смысловой	AGAGATGTTGAGTTGGCATC	58
	Антисмысловой	TAGGACCTGATAGCCATGC	
63	Смысловой	CAAGTGGCCAGATCCAATG	58
	Антисмысловой	GGTTCTCCTCTGCTAGGAC	
64	Смысловой	CCTACCTTGTCTTCCCATTG	58
	Антисмысловой	AGTTTCTCCCTGGGGAGC	
65	Смысловой	GAGCTAAGTGGCATATGTAC	58
	Антисмысловой	TGTACCTATGATATGATGATTC	