

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

« 12 »

2012г.

Регистрационный № 209-1212

**МЕТОД ДНК-ДИАГНОСТИКИ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ
САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА И ГЕСТАЦИОННОГО
ДИАБЕТА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно–практический
центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ:

к.б.н. Н.И. Моссэ, м.н.с. Е.А. Сулимчик

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
20.12.2012
Регистрационный № 209-1212

**МЕТОД ДНК-ДИАГНОСТИКИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ
К РАЗВИТИЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА
И ГЕСТАЦИОННОГО ДИАБЕТА**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук Н.И. Моссэ, Е.А. Сулимчик

Минск 2012

Инсулиннезависимые нарушения углеводного обмена признаны Всемирной организацией здравоохранения неинфекционными эпидемиями нашего времени в связи с широкой распространенностью среди населения, высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, ранней инвалидизацией и преждевременной смертностью.

На рубеже XX–XXI вв. был отмечен существенный рост заболеваемости сахарным диабетом типа 2 (СД2). Гестационный сахарный диабет (ГСД) — это диабет, выявленный у женщины во время беременности, у части женщин не исключен его переход в СД2. К факторам риска развития ГСД относят наличие СД2 у родственников первой степени родства и метаболический синдром у пациентки.

Изучение сахарного диабета имеет многолетнюю историю, но до сих пор факторы, приводящие к этому заболеванию, и их взаимодействие между собой до конца не изучены. В связи с этим изучение генетической предрасположенности к сахарному диабету имеет огромное значение. Одним из наиболее эффективных подходов для определения связи генетических факторов с возникновением диабета является использование полиморфных маркеров генов-кандидатов, т. е. тех генов, чьи белковые продукты (ферменты, регуляторные белки и пептиды, структурные белки) могут быть потенциально вовлечены в развитие этого заболевания.

В связи с этим целесообразно включать молекулярно-генетическое исследование полиморфных маркеров этих генов в комплексную программу диагностических и лечебно-профилактических мероприятий по планированию, ведению беременности, родов и послеродового периода у женщин с сахарным диабетом 2 типа, ГСД и метаболическим синдромом.

Принцип метода

Для идентификации аллельного полиморфизма используется амплификация специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обычными праймерами и дальнейшей рестрикцией продуктов ПЦР.

Анализ продуктов ПЦР проводится с помощью электрофореза в агарозном и полиакриламидном гелях.

Биологический материал

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Полимеразная цепная реакция

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

Реактивы: Taq полимеразы, соответствующий 10X буфер для ПЦР, 25мМ MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), праймеры, бидистиллированная деионизированная вода (H₂O).

Последовательности праймеров для синтеза фрагментов ДНК исследуемых генов:

- для определения полиморфизма rs7903146 гена TCF7L2:

5'ACAATTAGAGAGCTAAGCACTTTTTAGGTA3';

5'GTGAAGTGCCCAAGCTTCTC3';

- для определения Pro12Ala полиморфизма гена PPARG:

5'CCAATTCAAGCCCAGTCCTTTC3';

5'GCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG3';

- для определения полиморфизма Glu23Lys гена KCNJ11:

5'GACTCTGCAGTGAGGCCCTA3';

5'ACGTTGCAGTTGCCTTTCTT3';

- для определения полиморфизма Arg325Trp гена SLC30A8:

5'-ACGTTGGATGGCAATTTCTCTCCGAACCAC-3';

5'-ACGTTGGATGGCAATCAGTGCTAATCTCCC-3'.

Рестрикция

Материалы и оборудование: пробирки Eppendorf объемом 0,2 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками, термостат.

Реактивы: эндонуклеазы рестрикции RsaI, BstUI, BanII, FokI, рестрикционный буфер.

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в полиакриламидных гелях

Материалы и оборудование: камера для вертикального электрофореза, источник постоянного тока, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: бромфеноловый синий, ксиленцианол, 40% раствор сахарозы, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, трис, ЭДТА, борная кислота, персульфат аммония, ТЕМЕД, маркер молекулярного веса pBR322/MspI, H₂O.

Визуализация ДНК

Материалы и оборудование: кювета для окрашивания, трансиллюминатор, камера для фотографирования гелей.

Реактивы: бромистый этидий, H₂O.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Инсулиннезависимые нарушения углеводного обмена у женщин, планирующих беременность, беременных и родильниц.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Проведение ПЦР

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1x ПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 10 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq-полимеразы.

2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и 0,8 мкл исследуемой ДНК.

3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95°C. Затем выполняются 35 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 95°C, 1 мин отжига при 52–57°C (таблица) и 1 мин синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72°C.

Проведение рестрикции

1. Приготовить рестрикционную смесь из расчета 0,5 мкл рестриктазы и 1,2 мкл рестрикционного буфера на один исследуемый образец.

2. К 10 мкл продукта ПЦР добавить 1,2 мкл 10X рестрикционного буфера и 0,5 мкл (5 единиц активности) соответствующей эндонуклеазы (таблица). Центрифугировать несколько секунд.

3. Пробирки инкубировать в течение 12 ч при 37°C.

4.

Таблица — Параметры идентификации полиморфных аллелей генов TCF7L2, PPARG, KCNJ11 и SLC30A8

Полиморфизм	Эндонуклеаза	Размер анализируемых фрагментов	Условия ПЦР
rs7903146	RsaI	ПЦР-продукт — 197 п.о. После рестрикции: C/C — 197 п.о. T/T — 167 п.о. + 30 п.о. T/C — 197 п.о. + 167 п.о. + 30 п.о.	Температура отжига 55°C, 3 цикла
Pro12Ala	Bstul	ПЦР-продукт — 257 п.о. После рестрикции: Ala/Ala — 257 п.о. Pro/Pro — 223 п.о. + 34 п.о. Pro/Ala — 257 п.о. + 223 п.о. + 34 п.о.	Температура отжига 52°C, 35 циклов
Glu23Lys	BanII	ПЦР-продукт — 210 п.о. После рестрикции: Glu/Glu — 178 п.о. + 32 п.о. Glu/Lys — 178 п.о. + 150 п.о. + 32 п.о. + 28 п.о. Lys/Lys — 150 п.о. + 32 п.о. + 28 п.о.	Температура отжига 54°C, 35 циклов
Arg325Trp	FokI	ПЦР-продукт — 324 п.о. После рестрикции: Arg/Arg — 324 п.о. Arg/Trp — 324 п.о. + 245 п.о. + 79 п.о. Trp/Trp — 245 п.о. + 79 п.о.	Температура отжига 57°C, 30 циклов

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в полиакриламидных гелях

1. Подготовить камеру к заливке геля.

2. Приготовить соответствующий гель:

- для приготовления 15 мл 8% геля с соотношением мономеров 29:1 смешать 3,8 мл 30% полиакриламида, 1,5 мл 10X TBE, 9,7 мл H₂O, 60 мкл 20% персульфата

аммония, 20 мкл TEMED;

- для приготовления 5 мл 9% геля с соотношением мономеров 29:1 смешать 1,5 мл 30% полиакриламида, 0,1 мл 10X TBE, 3,4 мл H₂O, 25 мкл 20% персульфата аммония, 9 мкл TEMED;

- для приготовления 6 мл 7,5% геля с соотношением мономеров 29:1 смешать 1,5 мл 30% полиакриламида, 0,12 мл 10X TBE, 4,3 мл H₂O, 24 мкл 20% персульфата аммония, 8 мкл TEMED.

3. В пробирки, содержащие ПЦР-продукт, добавить 1/6 объема буфера для нанесения проб.

4. В лунки геля микропипеткой нанести образцы. В крайние левую и правую лунки нанести маркер молекулярного веса.

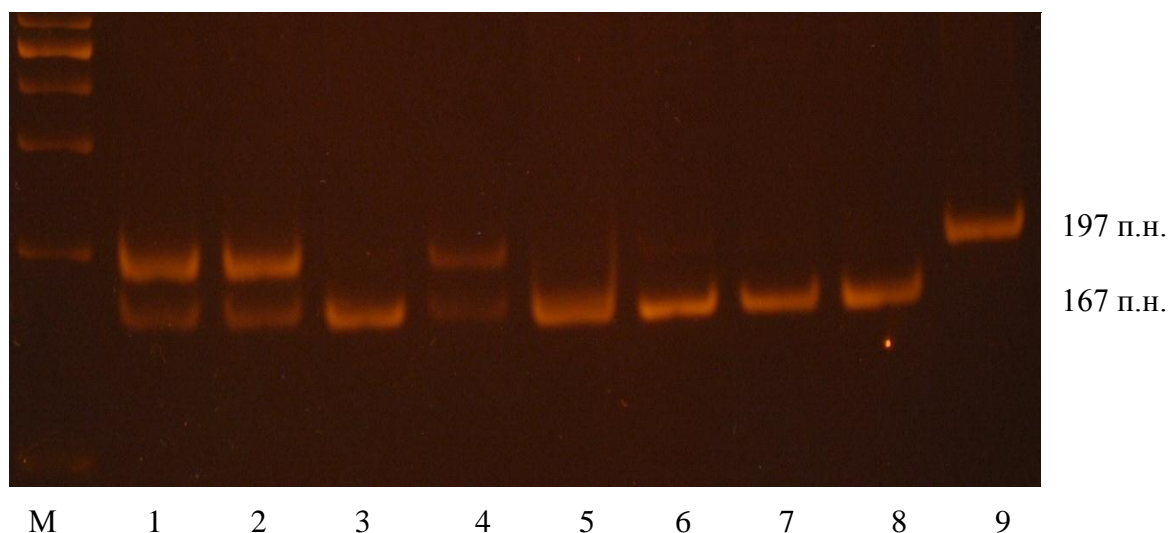
5. Камеру подключить к источнику тока. Электрофоретическое разделение проводить при 300–330 В.

Визуализация ДНК

После электрофореза гель помещают в кювету с раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Окрашивание происходит в течение 5–10 мин. Анализ и фотографирование электрофореграмм проводятся в ультрафиолетовом свете.

Интерпретация полученных данных

Определение аллелей проводят по наличию и положению фрагментов ДНК на электрофореграмме (рисунок 1). Например, при исследовании полиморфизма rs7903146 гена TCF7L2 продукт ПЦР размером 197 п.н. образуется в том случае, если в анализируемом образце присутствует аллель Т. Аллель С имеет размер 167 п.н. При генотипе С/Т наблюдаются два сигнала от фрагментов соответствующего размера.



М — маркер молекулярного веса; 1, 2, 4 — аллели Т/С; 3, 5–8 — аллели С/С, 9 — аллель Т/Т

Рисунок — Варианты генотипа по полиморфизму rs7903146 гена TCF7L2

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 желателно стерильную посуду;
- после работы с каждым объектом инструмент и используемые поверхности лабораторных столов протирать этанолом;
- 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 осаждаь растворы со стенок центрифугированием;
- в каждую серию проб включать в качестве контроля пробирку с поэтапным внесением всех применяемых растворов, но без ДНК (отрицательный контроль);
- при выделении ДНК и постановке ПЦР лицо сотрудника должно быть защищено экраном либо маской, работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.