

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный № 262-1215

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ
НА НОСИТЕЛЬСТВО ДЕЛЕЦИИ 7 ЭКЗОНА ГЕНА SMN1

инструкция по применению

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

Авторы:

к.м.н. Вильчук К.У., к.б.н. Гусина Н.Б., к.м.н. Гусина А.А., Мясников С.О.

Минск, 2015

Настоящая инструкция по применению (далее - инструкция) разработана с целью создания эффективного метода молекулярно-генетического тестирования на носительство делеции 7 экзона гена SMN1, который может быть использован в комплексе медицинских мероприятий для диагностики и медицинской профилактики спинальной мышечной атрофии (шифр МКБ-10 G12.0-12.1).

Область применения

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-генетиков, врачей-педиатров, врачей-неврологов, врачей-акушеров-гинекологов.

Показания к применению:

наличие в семье пациента с установленным диагнозом спинальной мышечной атрофии.

выявление носительства делеции 7 экзона гена SMN1 у лиц, планирующих деторождение.

пренатальная диагностика в семьях повышенного риска по спинальной мышечной атрофии.

Противопоказания к применению: нет.

Перечень необходимых медицинских изделий.

Медицинские изделия для выделения ДНК; проведения мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA); проведения количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР); анализа и документации полученных результатов.

Материал для исследования

Биологическим материалом для исследования является ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови человека, ворсин хориона, культивируемых клеток амниотической жидкости, других тканей человека.

Этапы молекулярно-генетического тестирования на носительство делеции 7 экзона гена SMN1.

Информационный этап – получение информированного согласия пациента в двух экземплярах согласно приложению.

Этап тестирования - выделение ДНК, определение числа копий 7 экзона гена SMN1 методом MLPA или КФ-ПЦР.

Алгоритм тестирования на носительство делеции 7 экзона гена SMN1 приводящей к развитию спинальной мышечной атрофии представлен на рисунке.

Выделение ДНК.

Выделение ДНК, сорбированной на носителях для проведения молекулярно-генетических исследований, проводится согласно рекомендациям производителя.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови, ворсин хориона, культивируемых клеток амниотической жидкости, других тканей человека проводится согласно стандартным методам.

Определение числа копий 7 экзона гена SMN1 методом MLPA или КФ-ПЦР.

Молекулярная диагностика носительства делеции 7 экзона гена SMN1 проводится диагностическим набором MLPA P060-SMA.

Проведение реакции MLPA.

Денатурация ДНК:

В пробирки внести по 5 мкл раствора, содержащего 50-100 нг ДНК (10-20 нг/мкл);

Пробирки поместить в амплификатор и провести первичную денатурацию образцов 5 мин. при 98 °С, затем охладить до 25 °С.

Гибридизационная реакция.

Приготовить гибридизационную смесь: смешать 1,5 мкл MLPA-буфера и 1,5 мкл смеси MLPA-зондов для каждого анализируемого образца ДНК.

Добавить 3 мкл гибридизационной смеси в каждую пробирку, содержащую образец денатурированной ДНК. Перемешать пипетированием.

Продолжить программу амплификатора: инкубация 1 мин. при 95 °С, затем инкубация 16-20 час при 60 °С.

Лигазная реакция.

Приготовить лигазную смесь: 3 мкл лигазного буфера А, 3 мкл лигазного буфера В, 1 мкл Лигазы-65 и 25 мкл ddH₂O для каждого образца.

Охладить образцы до 54 °С.

Добавить 32 мкл лигазной смеси в каждую пробирку и аккуратно перемешать пипетированием.

Продолжить программу: инкубация 15 мин. при 54 °С, затем 5 мин. при 98 °С.

ПЦР-реакция.

Приготовить ПЦР-смесь: 2 мкл ПЦР-праймеров, 0,5 мкл SALSA полимеразы и 7,5 мкл ddH₂O для каждого образца.

Охладить образцы до 20°С. Добавить 10 мкл ПЦР-смеси в каждую пробирку и аккуратно перемешать пипетированием.

Продолжить программу амплификатора: 35 циклов: 30 сек. при 95°С, 30 сек при 60°С, 1 мин. при 72°С, далее конечная элонгация 20 мин. при 72°С.

Обязательным условием при проведении реакции является использование не менее трех положительных контрольных образцов, в качестве которых можно использовать ДНК клинически здорового донора.

Обобщённая программа термоциклера, необходимая для проведения реакции MLPA:

денатурация ДНК: 1) 98° С – 5 минут; 2) 25° С – пауза;

гибридизационная реакция: 3) 95° С - 1 минута; 4) 60° С – пауза;

лигазная реакция: 5) 54° С - пауза; 6) 54° С - 15 минут; 7) 98° С - 5 минут; 8) 20° С – пауза;

ПЦР-реакция: 9) 35 циклов: 95° С – 30 секунд; 60° С – 30 секунд; 72° С – 60 секунд; 10) 72° С - 20 минут; 11) 4° С – хранение.

Фрагментный анализ MLPA-продуктов на генетическом анализаторе ABI3500.

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);

Проинкубировать полученную смесь 5 минут при 95° С; и охладить до 4 °С.

Поместить смесь в анализатор. Электрофорез проводится при следующих параметрах: длина капилляра 55 см, вольтаж инъекции 1,6 kV, время инъекции 15 секунд, полимер POP-7, вольтаж электрофореза 10 кВ, время электрофореза 55 минут.

Анализ данных

Предварительная обработка данных выполняется с помощью стандартного пакета компьютерных программ для генетического анализатора. Проводится визуальная оценка качества пиков: их наличие, электрофоретическая подвижность, интенсивность сигнала, наличие неспецифичных сигналов.

Анализ данных проводится с помощью программного обеспечения, предназначенного для обработки результатов MLPA типа Coffalyser.Net или аналогичного.

Интерпретация результатов. Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов $<0,6$ - одна копия гена SMN1, гетерозиготный носитель делеции. Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов $0,9-1,1$ - две копии гена SMN1, носительство делеции 7 экзона исключено.

Выполнения КФ-ПЦР.

Проведение ПЦР.

Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1хПЦР буфер, 1.5мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTP, по 2 пмоль праймеров SMN-7F и SMN-7R и по 2 пмоль праймеров BRCA1E11-F и BRCA1E11-R и 0,5 единиц активности полимеразы.

Таблица – Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации.

SMN-7F	6-FAM-CTATCAACTTAATTTCTGATCA
SMN-7R	CCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTTT
BRCA1E11-F	6-FAM-TGATTTGAACACCACTGAGA
BRCA1E11-R	CCGCSTATTCATTACATGTTT

В пробирки для ПЦР внести по 20 мкл амплификационной смеси и анализируемую ДНК в количестве 50-100 нг.

Пробирки поместить в термоциклер и провести денатурацию ДНК в течение 5 минут при 95°C. Затем выполнить 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 секунд денатурации

при 95°C, 30 секунд отжига при 55°C и 30 секунд синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 минут при 72°C.

После окончания ПЦР образцы поместить в холодильник.

Проведение рестрикции.

Смесь для проведения рестрикции объемом 18 мкл содержит: 6 мкл ПЦР продукта, 1x рестрикционный буфер и 5 единицы активности рестриктазы *DraI*. Инкубировать в течение 16 часов при 37°C.

Фрагментный анализ продуктов рестрикции на генетическом анализаторе ABI3500.

Продукт рестрикции в количестве 0,5 мкл смешать с 0,5 мкл маркера молекулярного веса LIZ 500 и 9 мкл формамида. Смесь инкубировать 3 минут при 95°C и охладить до 4 °C. Электрофорез проводится при следующих параметрах: полимер POP-7, длина капилляра 55 см., вольтаж электрофореза 15 кВ, время электрофореза 25 минут.

Анализ данных

Провести визуальную оценку качества паттерна пиков. Оценить наличие, величину сигнала и длину контрольных пиков.

Провести компьютерный анализ данных с помощью стандартного пакета компьютерных программ для генетического анализатора.

Провести расчет числа копий гена по формуле:

$$N = \left(\frac{\frac{SMN1_{п}}{BRCA_{п}}}{\frac{SMN1_{к}}{BRCA_{к}}} \right) \times 2$$

Где,

$SMN1_{п}$ – интенсивность флуоресценции пика $SMN1$ анализируемого образца,

$SMN1_{к}$ – интенсивность флуоресценции пика $SMN1$ контрольного образца, с числом копий гена $SMN1$ равным 2,

BRCAп – интенсивность флуоресценции пика BRCA анализируемого образца,

BRCAк – интенсивность флуоресценции пика BRCA контрольного образца.

Интерпретация результатов. Наличие 1-й копии гена SMN1 - гетерозиготный носитель делеции 7 экзона гена SMN1. Наличие 2-х копии гена SMN1 - носительство делеции 7 экзона гена SMN1 исключено.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении диагностики наследственных заболеваний и пути их устранения

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.

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.

Ошибки, связанные с неправильной интерпретацией полученных результатов. Для предупреждения ошибок в интерпретации результатов лабораторных исследований необходимо обучение и повышение квалификации специалистов.

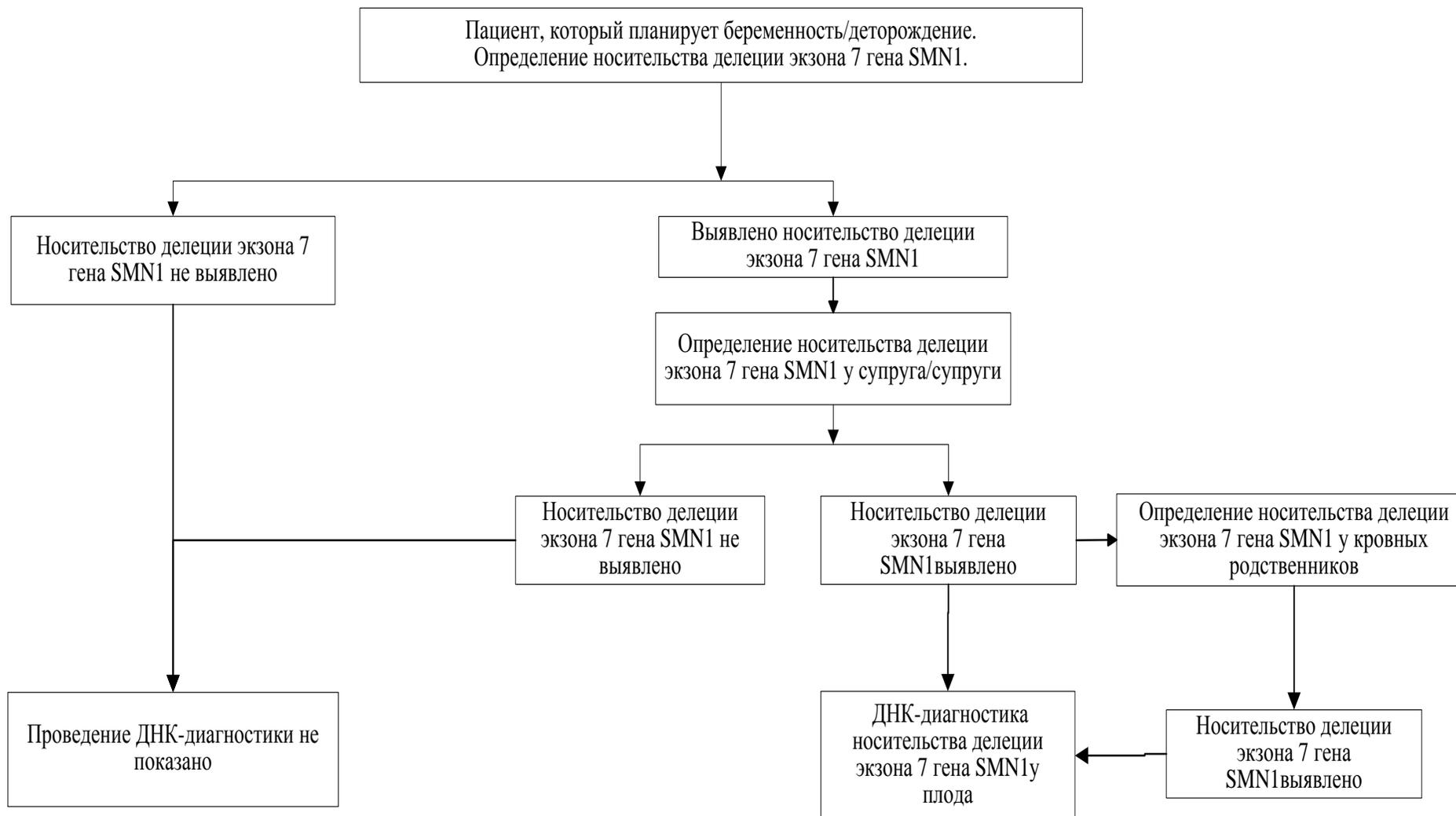


Рисунок - Алгоритм тестирования на носительство делеции 7 экзона гена SMN1

Название учреждения

**Информированное согласие на проведение ДНК-диагностики
спинальной мышечной атрофии**

Фамилия, имя, отчество	Дата рождения

Контактный адрес

Контактный телефон

Биологический материал

Я проинформирован (а), что:

1. полученный материал будет использован для проведения ДНК-диагностики спинальной мышечной атрофии;
2. существует вероятность разрушения ДНК (естественный процесс), что может потребовать повторного взятия биологического материала для исследования;
3. существует остаточный риск носительства заболевания;
4. по результатам ДНК-диагностики может быть необходима консультация врача-генетика;
5. могу отказаться от проведения ДНК-диагностики или ознакомления с результатами без объяснения причины. В случае моего отказа это никак не отразится на медицинской помощи, которую я буду получать в дальнейшем.

Я согласен (а) с тем, что:

результаты ДНК-диагностики могут быть использованы для научных исследований и могут войти в общую медико-генетическую документацию, при условии, что это не приведет к раскрытию охраняемой законом тайны.

Дата

Подпись

Спинальная мышечная атрофия

Спинальная мышечная атрофия (проксимальная спинальная мышечная атрофия, СМА) – наследственное заболевание, поражающее клетки спинного мозга, которые управляют мышцами. В результате развивается нарастающая слабость и паралич мышц, что приводит к невозможности двигаться, глотать, дышать.

Причиной СМА являются повреждения (мутации) гена SMN1. В большинстве случаев (95%) такое повреждение заключается в отсутствии (делеции) участка гена, который называется 7 экзоном гена SMN1.

Если оба родителя являются носителями делеции 7 экзона гена SMN1, то вероятность того, что ребенок унаследует от каждого родителя поврежденную копию гена и будет болен СМА, составляет 25% при каждой беременности. Выявление носительства делеции 7 экзона гена SMN1 и планирование семьи с учетом риска рождения больного ребенка - единственный эффективный способ профилактики СМА. В Беларуси частота носительства делеции 7 экзона гена SMN1 составляет 1:51, т.е. здоровым носителем является каждый 51-й житель.

Остаточный риск носительства – это вероятность оказаться носителем редких повреждений в гене SMN1, даже если при определении числа копий 7 экзона гена SMN1 признаков носительства заболевания не установлено. Современное состояние медицинской науки не позволяет исключить носительство повреждения в гене SMN1 со стопроцентной вероятностью.

Носительство делеции 7 экзона гена SMN1 не угрожает здоровью носителя, не является поводом для его дискриминации. Результаты ДНК-диагностики строго конфиденциальны и могут быть переданы только обследуемому лицу лично.

Целесообразно запланировать обследование до наступления беременности. При планировании деторождения для определения риска рождения ребенка больного СМА можно провести ДНК-диагностику супругам. Если супруги не являются носителями мутации гена SMN1, вероятность СМА у ребенка не велика. Если супруги являются носителями делеции 7 экзона гена SMN1 необходима консультация врача-генетика для оценки риска рождения больного ребенка и планирования пренатальной диагностики.