

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2016 г.

Регистрационный № 193-1115



**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ
СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНЫХ АТАКСИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ
МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ SCA1 (ATXN1), SCA2 (ATXN2), SCA3
(MJD) И SCA6 (CACNA1A)**

инструкция по применению

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

Авторы:

О.К. Кислова, к.б.н. Т.В. Осадчук, к.м.н. И.В. Наумчик

Минск, 2015

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) разработана с целью создания эффективной тактики ДНК-диагностики пациентов с распространенными формами наследственных спиноцеребеллярных атаксий (шифр по МКБ-10 G11) для повышения эффективности медико-генетического консультирования и пренатальной диагностики в семьях высокого риска.

Область применения

Инструкция предназначена для врачей-генетиков медико-генетических центров (отделений, консультаций), врачей-неврологов, врачей лабораторной диагностики.

Показания к применению:

1. Клинические признаки спиноцеребеллярной атаксии.
2. Подтвержденный диагноз наследственной спиноцеребеллярной атаксии у кровных родственников.
3. Семьи повышенного риска по спиноцеребеллярной атаксии – пренатальная диагностика.

Противопоказания к применению: нет.

Материал для исследования

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

Протокол выполнения диагностики нуклеотидных повторов в генах SCA

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 полимеразы, 10X буфер для ПЦР, содержащий 1,5мМ MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), DMSO, бидистиллированная деионизированная вода (H₂O). В качестве праймеров использовались олигонуклеотидные последовательности, фланкирующие участок гена SCA, содержащий (CAG)_n (CAT)_n (CAG)_n - повторы. Для анализа образцов ДНК в автоматическом анализаторе синтезировали ПЦР-продукт с флуоресцентной меткой. Для этой цели использовали меченый вариант праймера, представленный в таблице 1, имеющего молекулу FAM-6 на 3`-конце и фланкирующего участок гена SCA, содержащий (CAG)_n (CAT)_n (CAG)_n - повторы.

Таблица 1. Праймеры для диагностики генов наследственных спиноцеребеллярных атаксий

Тип СЦА – ген SCA	Forward primer	Reverse primer
СЦА 1 – АТХN1 (6p23)	CCAGACGCCGGGACAC	CCGGAGCCCTGCTGAGGT-FAM
СЦА 2 – АТХN2 (12q24)	GGGCCCTCACCATGTCG-FAM	CGGGCTTGCGGACATTGG
СЦА 3 – MJD (14q32.1)	CCAGTGACTTTGATTTCG-FAM	TGGCCTTTCACATGGATGTGAA
СЦА 6 – SCA1A(19p13)	CAGGTGTCCTATCCCTGTGATC C-FAM	TGGGTACCTCCGAGGGCCGCTGGTG

1.1 Методика определения аллелей в гене SCA1 (АТХN1)

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1xПЦР буфер, в состав которого входит 1,5мМ MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 3 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.
2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и 1 мкл образца ДНК.
3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 минут при 95°C. Затем выполняется 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 95°C, 1 мин отжига при 63°C и 30 сек синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 5 мин при 72°C.
4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

1.2 Методика определения аллелей в гене SCA2 (ATXN2)

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1xПЦР буфер, в состав которого входит 1,5мМ MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 4 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.
2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и 1 мкл образца ДНК.
3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 минут при 95°C. Затем выполняется 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 сек денатурации при 95°C, 30 сек отжига при 56°C и 45 сек синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 4 мин при 72°C.
4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

1.3 Методика определения аллелей в гене SCA3 (MJD)

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1xПЦР буфер, в состав которого входит 1,5мМ MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 4 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.
2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и 1 мкл образца ДНК.
3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 минут при 95°C. Затем выполняется 35 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 сек денатурации при 95°C, 45 сек отжига при 57°C и 1 мин синтеза

при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 4 мин при 72°C.

4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

1.4 Методика определения аллелей в гене SCA6 (CACNA1A)

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1xПЦР буфер, в состав которого входит 1,5мМ MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 2 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.
2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и 1 мкл образца ДНК.
3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 минут при 95°C. Затем выполняется 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 45 сек денатурации при 95°C, 45 сек отжига при 59°C и 1 мин синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 4 мин при 72°C.
4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

2. Проведение автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием

Материалы и оборудование: генетический анализатор с программным обеспечением, программируемый термостат, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: маркер молекулярного веса, деионизированный формамид, 4% раствор полимера, 10X ЭДТА буфер, H₂O.

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

Анализ проводить при следующих параметрах:

- длина капилляра – 47 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура – 60⁰С;
- время инъекции образца в капилляр 5 сек.;
- время разделения 28 мин.;
- напряжение 7,5 кВ.

Подготовка проб:

1. В пробирку добавить 1 мкл амплификата из каждой реакции, 1 мкл маркера молекулярного веса и 8 мкл деионизированного формамида.
2. Пробы денатурировать 2,5 мин. при 95⁰С.
3. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить во льду.
4. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.
5. 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.

3. Интерпретация полученных данных

Полученные данные анализируют, определяя количество (CAG)_n повторов в генах SCA.

3.1 Экспансия тринуклеотидных повторов CAG в гене ATXN1 (6p23):

- ≤38 повторов – нормальные аллели.
- Аллели с 39 и более повторами относятся к патологическим.

3.2 Экспансия тринуклеотидных повторов CAG в гене ATXN2 (12q24):

- ≤31 повторов – нормальные аллели.
- Аллели с 32 и более повторами относятся к патологическим.

3.3 Экспансия тринуклеотидных повторов CAG в гене MJD (14q32.1):

- ≤44 повторов – нормальные аллели.
- Аллели с 45 и более повторами относятся к патологическим.

3.4 Экспансия тринуклеотидных повторов CAG в гене SCA1A (19p13):

- ≤19 повторов – нормальные аллели.
- Аллели с 20 и более повторами относятся к патологическим.

Если экспансия нуклеотидных повторов в генах SCA не установлена – диагноз наследственной спиноцеребеллярной атаксии исключен, если экспансия нуклеотидных повторов в гене SCA установлена – диагноз наследственной спиноцеребеллярной атаксии подтвержден (шифр по МКБ-10 G11).

3.5 Примеры капиллярного электрофореза генов спинocerebellярной атаксии

Результат капиллярного электрофореза гена SCA1 (ATXN1) с нормальным количеством CAG-повторов приведен на рисунке 1 для гетерозиготы и на рисунке 2 для гомозиготы.

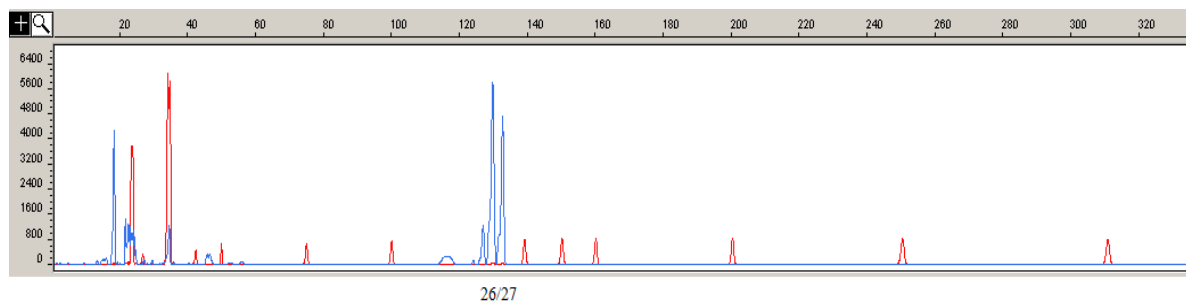


Рисунок 1 – Результат капиллярного электрофореза в гене SCA1 (ATXN1): аллели с 26 и 27 повторами, гетерозигота

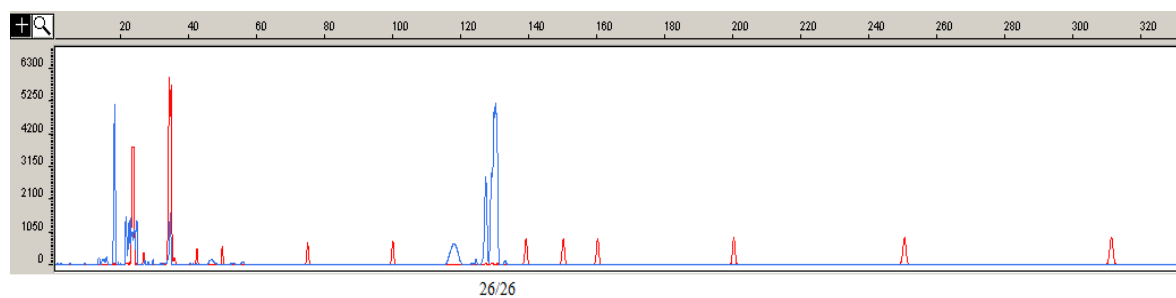


Рисунок 2 – Результат капиллярного электрофореза в гене SCA1 (ATXN1): аллели с 26 повторами, гомозигота

Экспансия CAG повторов в гене ATXN1 (6p23) представлена на рисунке 3.

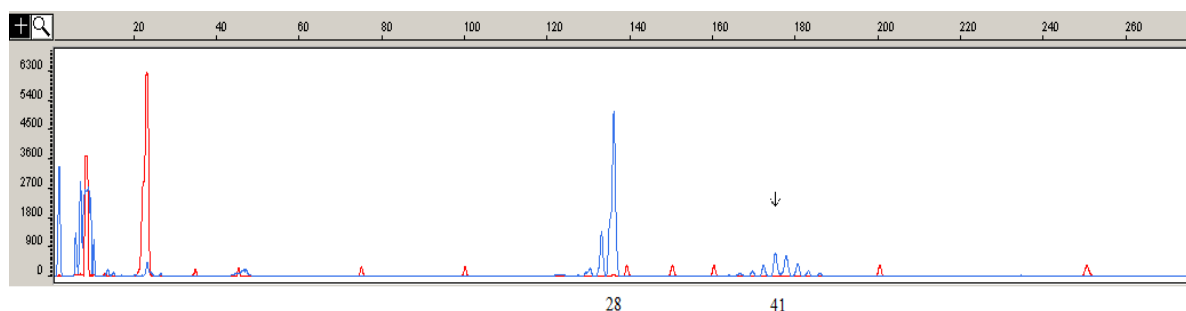


Рисунок 3 – Результат капиллярного электрофореза в гене SCA1 (ATXN1): аллели с 28 и 41 повторами, стрелкой указан мутантный аллель

Результат капиллярного электрофореза гена SCA2 (ATXN2) с нормальным количеством CAG-повторов приведен на рисунке 4 для гетерозиготы и на рисунке 5 для гомозиготы.

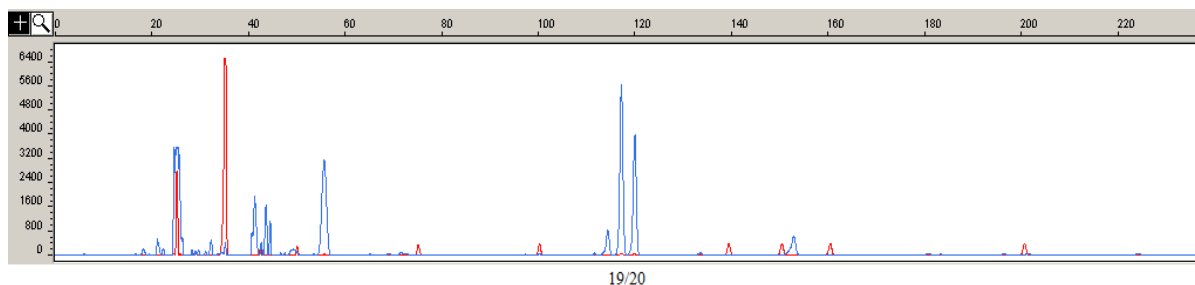


Рисунок 4 - Результат капиллярного электрофореза образца ДНК в гене SCA2 (ATXN2): аллели с 19 и 20 повторами, гетерозигота

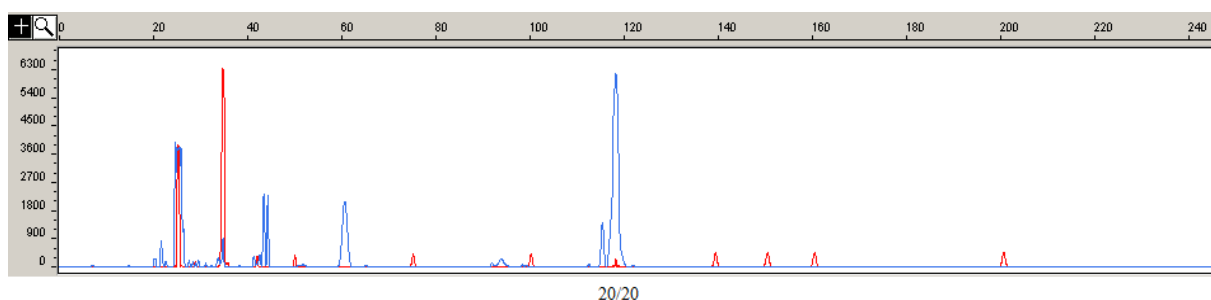


Рисунок 5 - Результат капиллярного электрофореза образца ДНК в гене SCA2 (ATXN2): аллели с 20 повторами, гомозигота

Экспансия CAG повторов в гене ATXN2 (12q24) представлена на рисунках 6 и 7.

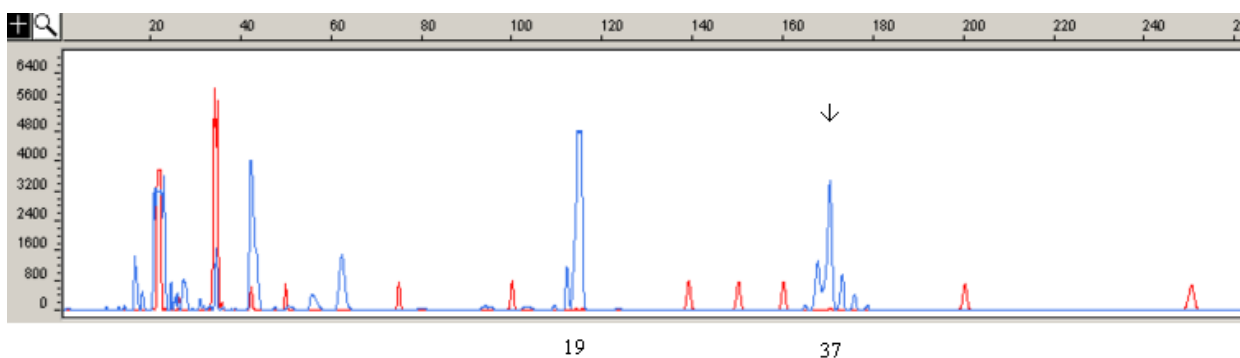


Рисунок 6 - Результат капиллярного электрофореза образца ДНК в гене SCA2 (ATXN2): аллели с 19 и 37 повторами, стрелкой указан мутантный аллель

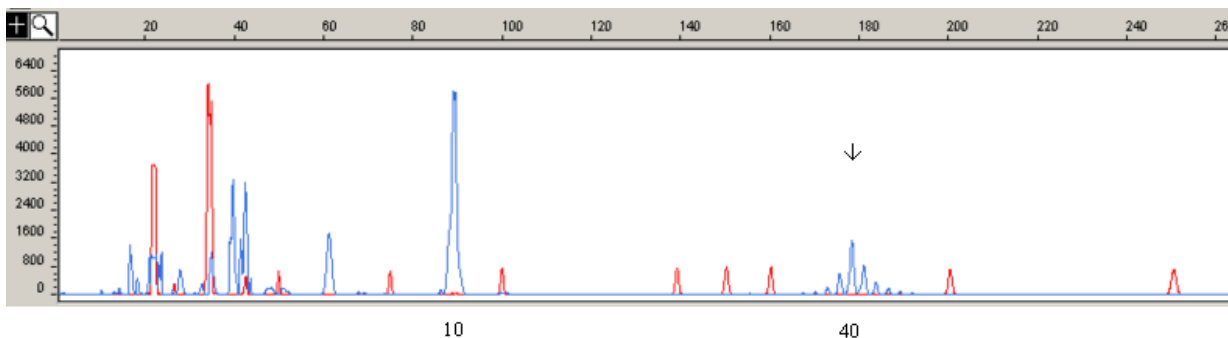


Рисунок 7 - Результат капиллярного электрофореза образца ДНК в гене SCA2 (ATXN2): аллели с 10 и 40 повторами, стрелкой указан мутантный аллель

Перечень возможных осложнений или ошибок 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. 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, желательно, 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 осаждать 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 работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

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