

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«» 2015 г.

Регистрационный № 263-1215

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ НА  
НОСИТЕЛЬСТВО ДЕЛЕЦИЙ И ДУПЛИКАЦИЙ ЭКЗОНОВ ГЕНА DMD  
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 тестирования на носительство делеций и дупликаций экзонов гена DMD, который может быть использован в комплексе медицинских мероприятий для диагностики и медицинской профилактики мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера (шифр МКБ-10 G71.0).

### **Область применения**

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

### **Показания к применению:**

Клинические признаки наследственного нервно-мышечного заболевания.

Наличие в семье пациента с подтвержденным диагнозом мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера

Пренатальная диагностика в семьях с высоким риском рождения мальчика с мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера.

**Противопоказания к применению:** проведение тестирования не показано лицам при отсутствии признаков наследственного нервно-мышечного заболевания у пациента или членов его семьи.

### **Перечень необходимых медицинских изделий.**

Медицинские изделия необходимые для выделения ДНК; проведения мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA); анализа и документации полученных результатов.

### **Материал для исследования**

Биологическим материалом для исследования является ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, фибробластов, ворсин хориона, культивируемых амниоцитов, других тканей человека.

## **Этапы тестирования на носительство мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера.**

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

Этап тестирования - выделение ДНК, определение делеций и дупликаций экзонов гена DMD.

Алгоритм тестирования на носительство делеций и дупликаций экзонов гена DMD, приводящих к развитию мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера, представлен на рисунке.

### **Выделение ДНК.**

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови, фибробластов, ворсин хориона, культивируемых амниоцитов, других тканей человека проводится по стандартным методам.

### **Определение делеций и дупликаций экзонов гена DMD.**

Молекулярно-генетическое тестирование носительства делеций и дупликаций экзонов гена DMD проводится диагностическими наборами MLPA P034DMD и P035DMD.

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<sup>0</sup>С, затем инкубация 16-20 час при 60<sup>0</sup>С.

Лигазная реакция:

приготовить лигазную смесь: 3 мкл лигазного буфера А, 3 мкл лигазного буфера В, 1 мкл Лигазы-65 и 25 мкл ddH<sub>2</sub>O для каждого образца; охладить образцы до 54<sup>0</sup>С;

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

Продолжить программу: инкубация 15 мин. при 54<sup>0</sup>С, затем 5 мин. при 98<sup>0</sup>С.

ПЦР-реакция:

приготовить ПЦР-смесь: 2 мкл ПЦР-праймеров, 0,5 мкл SALSA полимеразы и 7,5 мкл ddH<sub>2</sub>O для каждого образца;

охладить образцы до 20<sup>0</sup>С, добавить 10 мкл ПЦР-смеси в каждую пробирку и аккуратно перемешать пипетированием.

Продолжить программу амплификатора: 35 циклов: 30 сек. при 95<sup>0</sup>С, 30 сек при 60<sup>0</sup>С, 1 мин. при 72<sup>0</sup>С, далее конечная элонгация 20 мин. при 72<sup>0</sup>С.

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

Ниже приведена обобщённая программа термоциклера, необходимая для проведения реакции MLPA.

Денатурация ДНК: 1) 98<sup>0</sup> С – 5 минут; 2) 25<sup>0</sup> 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.

Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов 0,4-0,6 - гетерозиготный носитель делеции экзонов гена DMD.

Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов 1,4-1,6 - гетерозиготный носитель дупликации экзонов гена DMD.

Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов 0,9-1,1 - носительство делеции или дупликации экзонов гена DMD 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 срок годности 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.

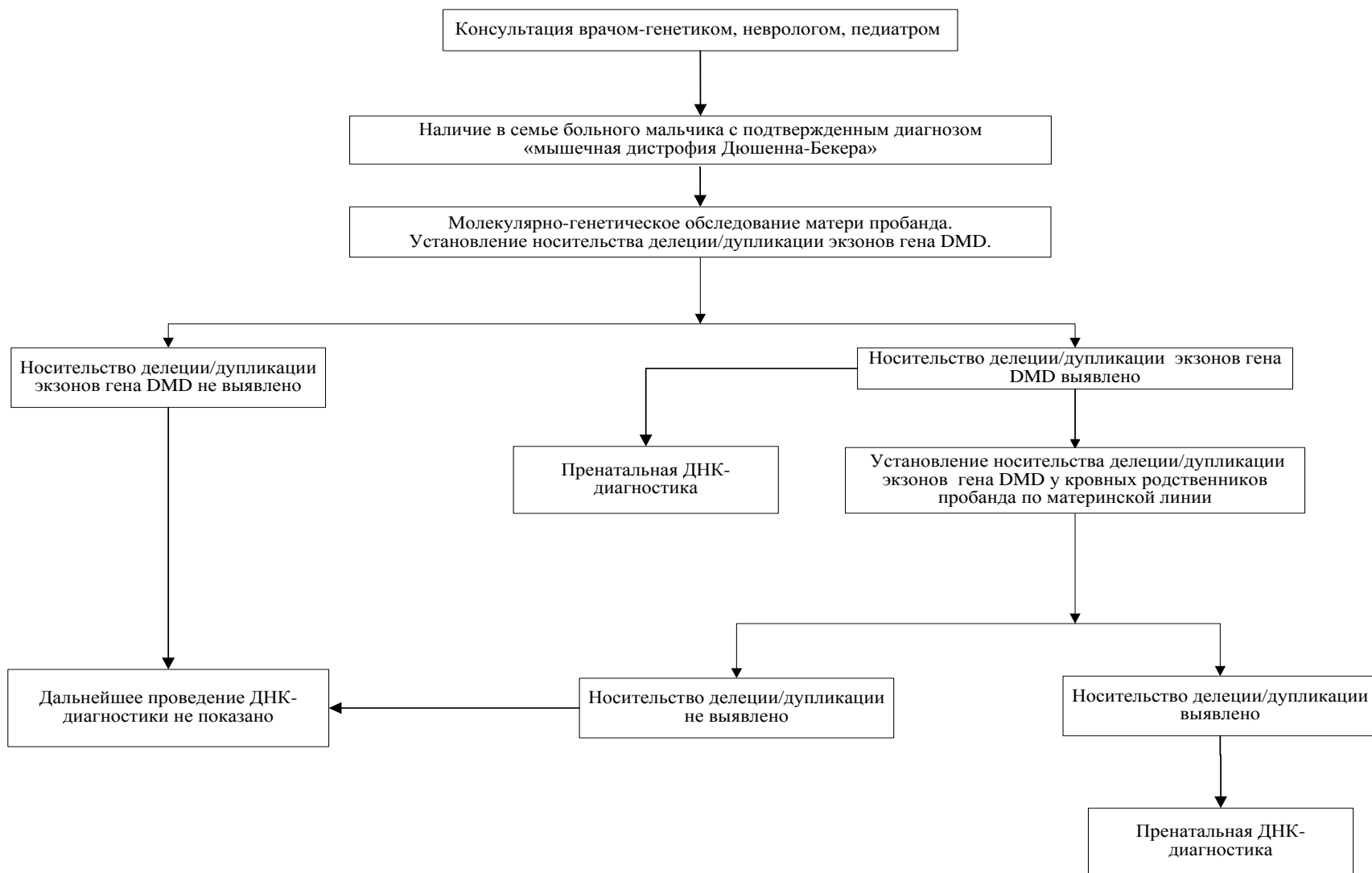


Рисунок - Алгоритм тестирования на носительство делеции или дупликации экзонов гена DMD

## Приложение к инструкции

### Название учреждения

#### Информированное согласие на проведение ДНК-диагностики мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера

Фамилия, имя, отчество	Дата рождения

Контактный адрес

---

Контактный телефон

---

Биологический материал

---

Я проинформирован (а), что:

1. полученный материал будет использован для проведения ДНК-диагностики мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера;
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



## **Мышечная дистрофия Дюшенна-Бекера**

Мышечная дистрофия Дюшенна-Бекера – наследственное заболевание, связанное с нарушением образования белка дистрофина. Нарушение образования дистрофина приводит к нарастающему разрушению мышц, что сопровождается развитием сердечной недостаточности и невозможностью самостоятельно передвигаться.

Причиной мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера являются повреждения (мутации) гена DMD. В большинстве случаев (65-75%) такое повреждение заключается в отсутствии (делеции) или удвоении (дупликации) крупного участка (экзона) гена DMD. У части пациентов (25-35%) выявляют другие повреждения этого гена - точковые мутации.

Женщины, как правило, не болеют мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера. Тем не менее, мутация может быть передана ребенку. Если поврежденный ген унаследует мальчик, то у него разовьется заболевание. Если женщина является носителем мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера, то вероятность того, что её сын унаследует мутацию гена DMD и будет болен мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера, составляет 50% при каждой беременности мальчиком. При беременности девочкой вероятность того, что дочь унаследует мутацию гена DMD, и будет носителем мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера, также составляет 50% при каждой беременности девочкой.

Выявление носительства мутации гена DMD и планирование семьи с учетом риска рождения больного ребенка - единственный эффективный способ профилактики мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера.

Остаточный риск - это вероятность рождения мальчика с мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера, даже если при исследовании гена DMD признаков носительства заболевания не обнаружено. Существование остаточного риска обусловлено тем, что в 30% случаев развитие мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера обусловлено мутацией возникшей *de novo* (не унаследованной от матери).

Носительство мутации гена DMD приводящей к развитию мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера не угрожает здоровью носителя, не является поводом для его дискриминации. Результаты ДНК-диагностики строго конфиденциальны и могут быть переданы только обследуемому лицу лично.

При планировании деторождения для определения риска рождения ребенка больного мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера необходима консультация врача-генетика.