

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2016 г.

Регистрационный № 194-1115



**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ МОТОРНО-СЕНСОРНОЙ НЕЙРОПАТИИ
I ТИПА, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ТОЧЕЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ
В ГЕНЕ PMP22**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Т.В. Осадчук, к.м.н. Н.В. Румянцева, к.м.н. И.В. Наумчик

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярно-генетической диагностики наследственной моторно-сенсорной нейропатии, обусловленной точечными мутациями в гене PMP22, который может быть использован 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

Наследственная моторно-сенсорная нейропатия (НМСН, шифр по МКБ-10 G60.0) с поражением периферических нервов (двигательных и чувствительных), слабостью и атрофией мышц, нарушением походки и деформацией конечностей, а также различными сенсорными нарушениями (утрата болевой, тактильной и температурной чувствительности) после исключения трех наиболее частых подтипов НМСН: НМСН IA (дупликация гена PMP22), НМСН IB (точечные мутации в гене MPZ) и НМСН IX (точечные мутации в гене GJB1).

Алгоритм ДНК-диагностики наиболее частых форм наследственной моторно-сенсорной нейропатии I типа отображен на рисунке 1.

Противопоказания к применению метода отсутствуют.

Алгоритм ДНК-диагностики наиболее частых форм наследственной моторно-сенсорной neuropathии I типа (НМСН)

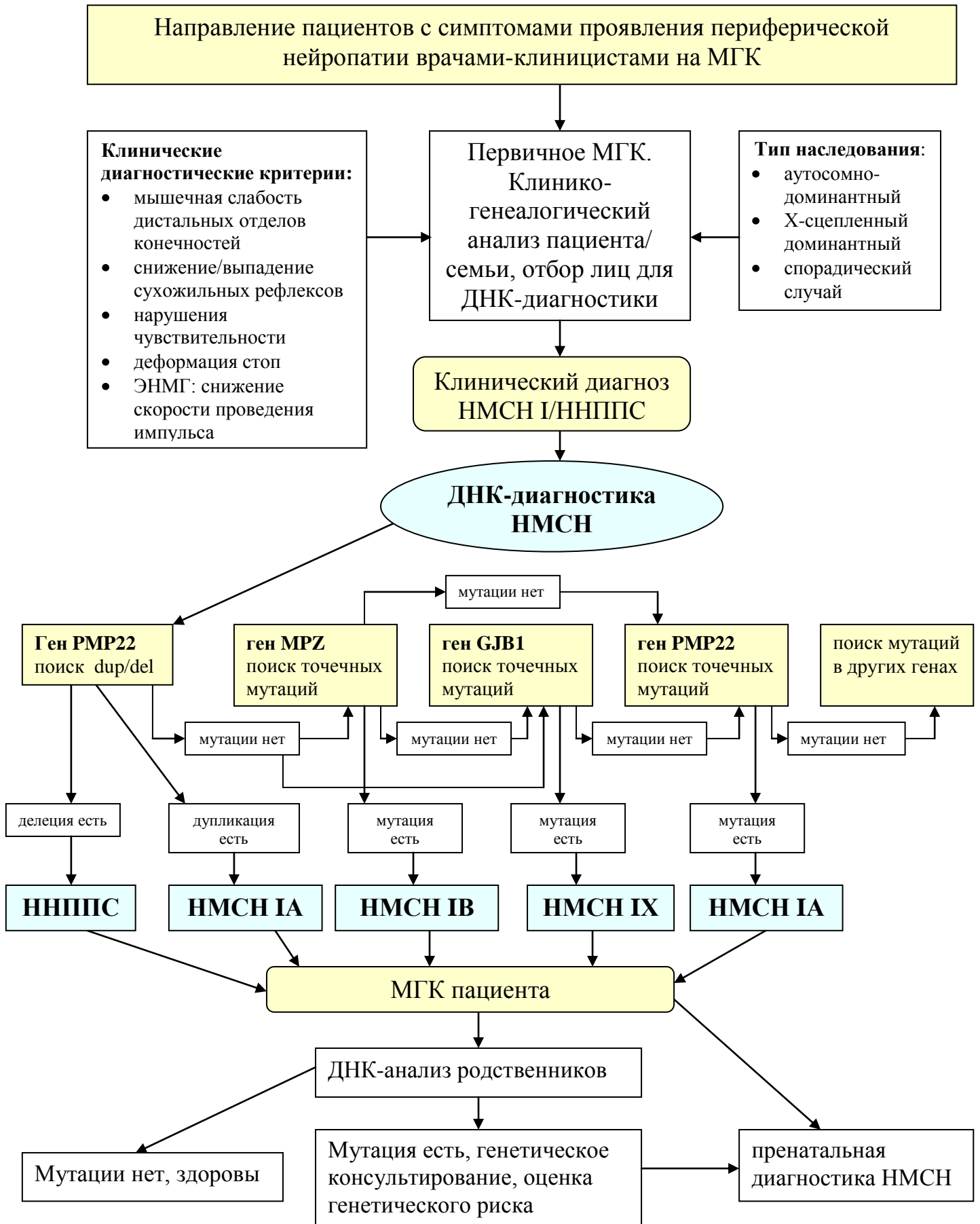


Рисунок 1 - Алгоритм ДНК-диагностики

Метод выявления точечных мутаций в гене PMP22 у пациентов с наследственной моторно-сенсорной нейропатией I типа

1. Перечень необходимого оборудования и реактивов

Биологический материал

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

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

Последовательности праймеров для синтеза фрагментов гена PMP22:

ex1 1F CTCCTCGCAGGCAGAAACTC
1R CTGAACCAGCAGGAGCACGGG
ex2 2F TCAGGATATCTATCTGATTCTC
2R AAGCTCATGGAGCACAAAACC
ex3 3F TGGCCAGCTCTCCTAAC
3R CACCCCGCTTCCACATG
ex4 4F GCCATGGACTCTCCGTC
4R CCTATGTACGCTCAGAG

Проведение секвенирующей реакции

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: набор для сиквенса, 5X буфер для сиквенса, прямой и обратный праймеры, бидистиллированная вода.

Проведение автоматического капиллярного электрофореза

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

Реактивы: формамид, 4% раствор полимера для заполнения капилляра, 10X ЭДТА буфер, бидистиллированная вода.

2. Методика определения аллелей

Проведение ПЦР

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1xПЦР буфер, 2.5мМ MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.
2. В пробирки для ПЦР внести по 19 мкл амплификационной смеси и образец 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 60°C и 1 мин синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72°C.
4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

Проведение секвенирующей реакции

1. В пробирки для ПЦР внести по 4 мкл секвенирующей смеси, 2 мкл секвенирующего буфера, 2 пмоль прямого или обратного праймера, 4 мкл ПЦР-продукта и бидистиллированной воды до 20 мкл.
2. Пробирки поместить в амплификатор и провести 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 10 сек денатурации при 96°C, 5 сек отжига при 50°C и 4 мин синтеза при 60°C.
3. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

Проведение автоматического капиллярного электрофореза

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

Анализ проводить при следующих параметрах:

- длина капилляра – 36 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура – 50°C;
- время инъекции образца в капилляр 5 сек.;
- время разделения 36 мин.;
- напряжение 11 кВ.

Подготовка проб:

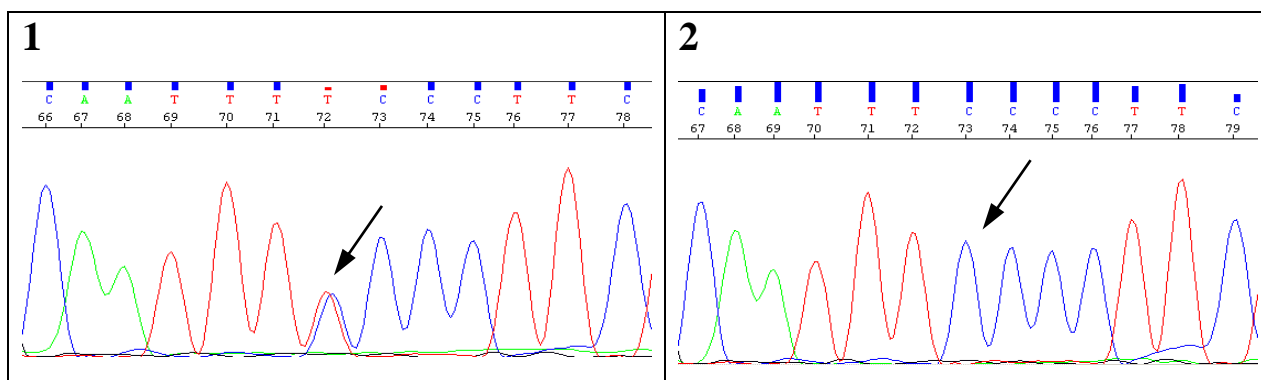
1. В пробирку с высушенным продуктом секвенирующей реакции добавить 15 мкл формамида.
2. Встряхивать на вортексе до полного растворения.
3. Пробы денатурировать 2 мин при 95°C.
4. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить во льду.
5. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.
6. 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.

Интерпретация полученных данных

При выполнении прямого секвенирования, идентификацию мутаций проводят исходя из зафиксированных изменений в последовательности нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК (рисунок 2). При обнаружении мутации в гене PMP22 ставится диагноз: наследственная моторно-сенсорная нейропатия IA типа (шифр по МКБ-10 G60.0).



Примечание 1 – однонуклеотидная замена в гетерозиготном состоянии; 2 – норма. Стрелкой отмечено место нуклеотидной замены.

Рисунок 2 – Результаты секвенирования второго экзона гена PMP22

Перечень возможных осложнений или ошибок при определении мутаций 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, 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 осаждают 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.

В лаборатории необходимо выделять несколько зон:

- Зона экстрагирования ДНК – в ней осуществляют все этапы обработки биологического материала и выделения геномной ДНК.
- Зона проведения ПЦР – предназначена для внесения в пробирки компонентов амплификационной смеси и ДНК, а также для проведения амплификации. В зонах экстрагирования ДНК и проведения ПЦР (первой и второй) не следует открывать пробирки с продуктами амплификации, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне.
- Зона анализа продуктов ПЦР – в ней проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.