

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

28.09.2012 г.

Регистрационный № 050-0412

**МЕТОД ДНК-ДИАГНОСТИКИ ЧИСЛОВЫХ АНОМАЛИЙ
ХРОМОСОМ 13, 18, 21, X, Y НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ
КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ:

Канд. биол. наук Т.В. Осадчук, канд. биол. наук К.А. Мосса

Минск 2012

В настоящей инструкции по применению представлен метод ДНК-диагностики числовых аномалий хромосом 13, 18, 21, X и Y (анеуплоидий), которые являются самой частой причиной врожденной патологии человека.

Показания к применению

Молекулярно-генетический анализ может быть рекомендован для выявления трисомии хромосом 21 (синдром Дауна), 13 (синдром Патау), 18 (синдром Эдвардса), моносомии X (синдром Шерешевского-Тернера), полисомии X, дополнительной хромосомы X в мужском кариотипе (синдром Кляйнфельтера), триплоидии:

- при проведении пренатальной диагностики у плодов, имеющих высокий риск хромосомной патологии;
- новорожденным и пациентам с клиническими признаками хромосомной патологии;
- при установлении диагноза у плодов, удалённых по медико-генетическим показаниям.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, может применяться также для установления родительского происхождения дополнительной хромосомы при анеуплоидии или хромосомного набора при триплоидии.

Противопоказания к применению методов отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ

Биологический материал

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, клеток амниотической жидкости, тканей, ворсин хориона, а также небольшие фрагменты пятен крови, высушенные на специальных бланках.

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 полимераза, соответствующий 10X буфер для ПЦР, 25 мМ MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), праймеры, фланкирующие участок ДНК, содержащий анализируемый полиморфизм (табл. 1), бидистиллированная деионизированная вода (H₂O).

Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании в автоматическом анализаторе используется меченый вариант праймера, имеющий молекулу «репортер» (FAM, NED, VIC, PET) на 5'-конце.

Автоматический капиллярный электрофорез 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.

Таблица 1

Основные параметры микросателлитных маркеров хромосом 21, 13, 18, X и Y, отобранных для диагностики анеуплоидии

| Хромосома | Маркер | Область локализации | Размер | Концентрация | Последовательность праймеров | Метка |
|-----------|----------|---------------------|---------|---------------------------------|-----------------------------------|-------|
| 21 | D21S11 | q22.1 | 225-280 | 6 pM | TTT CTC AGT CTC CAT AAA TAT GTG | FAM |
| | | | | 6 pM | GAT GTT GTA TTA GTC AAT GTT CTC | |
| | D21S1411 | q22.3 | 256-340 | 6 pM | ATA GGT AGA TAC ATA AAT ATG ATG A | NED |
| | | | | 6 pM | TAT TAA TGT GTG TCC TTC CAG GC | |
| | D21S1435 | q21.3 | 160-200 | 3 pM | CCC TCT CAA TTG TTT GTC TAC C | FAM |
| | | | | 3 pM | ACA AAA GGA AAG CAA GAG ATT TCA | |
| 13 | D13S634 | q21.33 | 385-440 | 2 pM | GGC AGA TTC AAT AGG ATA AAT AGA | FAM |
| | | | | 2 pM | GTA ACC CCT CAG GTT CTC AAG TCT | |
| | D13S252 | q12.2 | 260-330 | 10 pM | GCA GAT GTA CTG TTT TCC TAC CAA | PET |
| | | | | 10 pM | AGA TGG TAT ATT GTG GGA CCT TGT | |
| | D13S305 | q13.3 | 430-465 | 7 pM | GCC TGT TTG AGG ACC TGT CGT TA | VIC |
| | | | | 7 pM | TGG TTA TAG AGC AGT TAA GGC AC | |
| | D13S325 | q14.11 | 235-320 | 5 pM | TCC TTT AAG TGT CTA GAG AGG AGG | VIC |
| | | | | 5 pM | TCT CTC TCA GAA GTT TGG AAG C | |
| 18 | D18S535 | q12.3 | 455-500 | 5 pM | CAG CAA ACT TCA TGT GAC AAA AGC | FAM |
| | | | | 5 pM | CAA TGG TAA CCT ACT ATT TAC GTC | |
| | D18S386 | q22.1 | 330-400 | 10 pM | TGA GTC AGG AGA ATC ACT TGG AAC | VIC |
| | | | | 10 pM | CTC TTC CAT GAA GTA GCT AAG CAG | |
| | D18S390 | q22.3 | 272-300 | 5 pM | TAA CCA AAG CAA ATC CCT GG | NED |
| | | | | 5 pM | CAC TTA CAC TGT TAT CCT GG | |
| D18S391 | p11.31 | 140-180 | 1,5 pM | GGA CTT ACC ACA GGC AAT GTG ACT | VIC | |
| | | | 1,5 pM | TAG ACT TCA CTA TTC CCA TCT GAG | | |
| X | DXS981 | q13.1 | 225-260 | 3 pM | CTC CTT GTG GCC TTC CTT AAA TG | NED |
| | | | | 3 pM | TTC TCT CCA CTT TTC AGA GTC A | |
| | DXS1187 | q26.2 | 122-170 | 1,5 pM | CAG CTA CTC AAT GAA AAG CC | NED |
| | | | | 1,5 pM | TGA TGG AGA AAG TCA CTG AAC | |
| Y | AMEL | Xp22.22/ | 104/110 | 1,5 pM | CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG | FAM |

| | | | | | | |
|--|--------|--------|---------|--------|---------------------------------|-----|
| | | Yp11.2 | | 1,5 pM | ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG | |
| | DYS448 | q11.22 | 323-381 | 2 pM | TGTCAAAGAGCTTCAATGGAGA | FAM |
| | | | | 2 pM | TCTTCCTTAACGTGAATTTCTC | |

МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ХРОМОСОМ 13, 18, 21, X, Y

Проведение ПЦР

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 25 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 25 мкл содержит 1xПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 200 мкM dATP/dCTP/dTTP/dGTP, от 1,5 до 10 пM 15 пар праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.
2. В пробирки для ПЦР внести по 24,5 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.
3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 10 мин при 94 °C, в течение 3 мин при 58 °C. Затем выполняется 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 94 °C, 1 мин отжига при 57 °C и 2 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 автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием

Подготовку к работе генетического анализатора выполняют в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ производят при следующих параметрах:

- длина капилляра – 47 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура – 60 °С;
- время инъекции образца в капилляр 5 с;
- время разделения 28 мин;
- напряжение 7,5 кВ.

Подготовка проб:

1. В пробирку добавить 0,7 мкл амплификата из каждой реакции, 0,7 мкл маркера молекулярного веса и 8 мкл деионизированного формамида.
2. Пробы денатурировать 4 мин при 95 °С.
3. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить во льду.
4. Установить микропробирки в штатив анализатора.

Анализ проб:

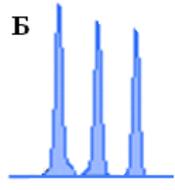
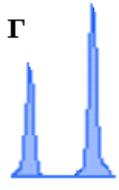
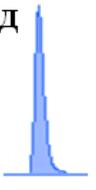
1. Установить штатив с микропробирками в анализатор.
2. Задать необходимые параметры анализа в программе сбора данных.
3. Запустить программу сбора данных.
4. После окончания разделения образцов и сбора данных перенести результаты в программу анализа данных.
5. Проанализировать полученные данные.

Интерпретация полученных данных

Полученные данные анализируют, определяя количество аллелей микросателлитных маркеров соответствующих хромосом на электрофореграмме. Принцип метода заключается в том, что при анализе маркера, имеющего высокую степень полиморфизма, его аллели с большой вероятностью будут различаться в каждом из исследуемых локусов генома пациента. Такой анализ позволяет увидеть

столько аллелей маркера, сколько локусов или сцепленных с ним генов присутствует в геноме.

В норме это число составляет два для локусов аутосомных хромосом и хромосомы X у женщин и один для половых хромосом у мужчин. У пациентов с трисомиями аутосом маркеры будут иметь три аллеля за счет дополнительной хромосомы. У пациентов с моносомиями маркеры будут иметь один аллель за счет отсутствия одной из хромосом. Вероятность того, что все три аллеля маркера будут различаться по размеру, зависит от типа маркера и степени его полиморфизма, который определяется уровнем гетерозиготности в популяции. Интерпретация результатов проводится с учетом количества пиков и их относительной высоты на электрофореграмме. Различные варианты электрофореграмм, которые могут быть получены при анализе микросателлитных маркеров, представлены на рис. 1.

| | Норма | Три аллеля | | | Неинформативно |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| | Отношение высот пиков между 0,8 и 1,4 | Присутствие трех пиков почти равной высоты | Соотношение высот пиков более 1,8 | Соотношение высот пиков менее 0,65 | Единичный пик |
| Примеры |  |  |  |  |  |
| | генотипы | | | | |
| аутосома 18 (D18S390) | 276/280 | 276/280/284 | 276/276/280 | 276/284/284 | 276? * |
| половые хромосомы X и Y (AMEL) | 104/109 X Y | — | 104/104/109 X X Y | 104/109/109 X Y Y | 104? * X |

Примечание: * количество аллелей определить невозможно.

Рис. 1. Различные варианты сочетания аллелей микросателлитных маркеров

В норме при использовании одного микросателлитного маркера на электрофореграмме можно увидеть два различных варианта: два пика с отношением высот между 0,8 и 1,4 (гетерозигота – рис. 1А) или один пик (гомозигота – рис. 1Д). Обнаружение одного пика не позволяет точно определить, сколько аллелей, а соответственно и генов, имеет данный человек.

При обнаружении трисомии с использованием одного маркера на электрофореграмме могут быть следующие варианты:

1. Присутствие трех пиков почти равной высоты (рис. 1Б) – наличие в геноме трех различных аллелей анализируемого маркера.

2. Присутствие двух пиков с соотношением между ними более 1,8 (рисунок 1В) – наличие в геноме трех аллелей: больший по высоте пик представлен двумя аллелями одной длины (меньшей), а меньший по высоте пик представлен третьим аллелем (большей длины) – дозовый эффект.

3. Присутствие двух пиков с соотношением между ними 0,65 (рисунок 1Г) – наличие в геноме трех аллелей: меньший по высоте пик представлен одним аллелем (меньшей длины), больший по высоте пик представлен двумя аллелями одной длины (большей) – дозовый эффект.

4. Присутствие одного пика (такой маркер является неинформативным) – рис. 1Д. В отношении хромосомы X возможно предполагать как моносомию, так и нормальный женский кариотип (гомозиготу).

Эффективности исследования, а также сокращения времени и затрат на молекулярно-генетический анализ можно добиться путем одновременного определения нескольких маркеров на одну хромосому, поскольку как минимум один из них будет информативным.

Разработанный протокол позволяет одновременно анализировать 15 микросателлитных маркеров на 5 хромосом (13, 18, 21, X и Y). Пример данной диагностики представлен на рис. 2 (патология отсутствует).

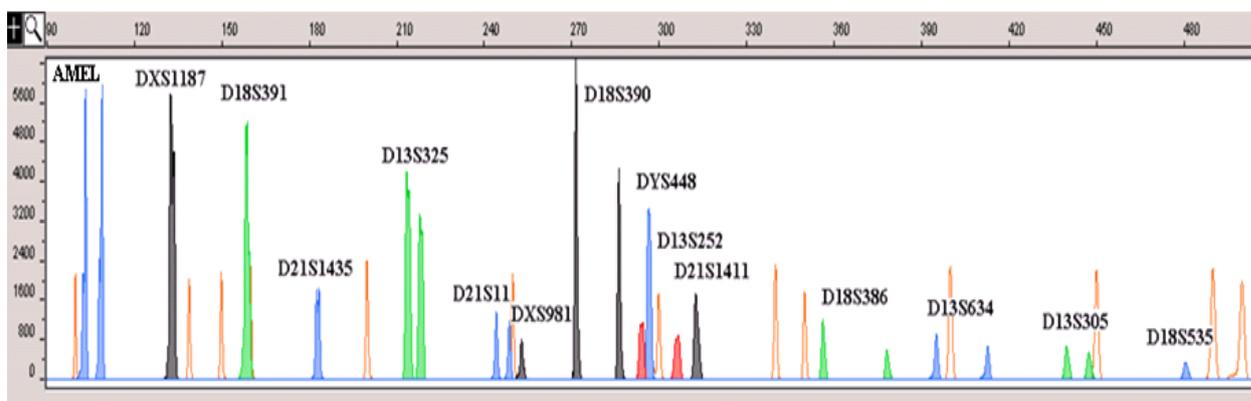


Рис. 2. Результаты ДНК-анализа 15 микросателлитных маркеров хромосом 21, 13, 18, X, Y – патология не выявлена

На рис. 3 приведены электрофореграммы с различными анеуплоидиями (трисомии хромосом 21, 13, 18, моносомия хромосомы X, дополнительная хромосома X в мужском кариотипе), информативные по нескольким микросателлитным маркерам.

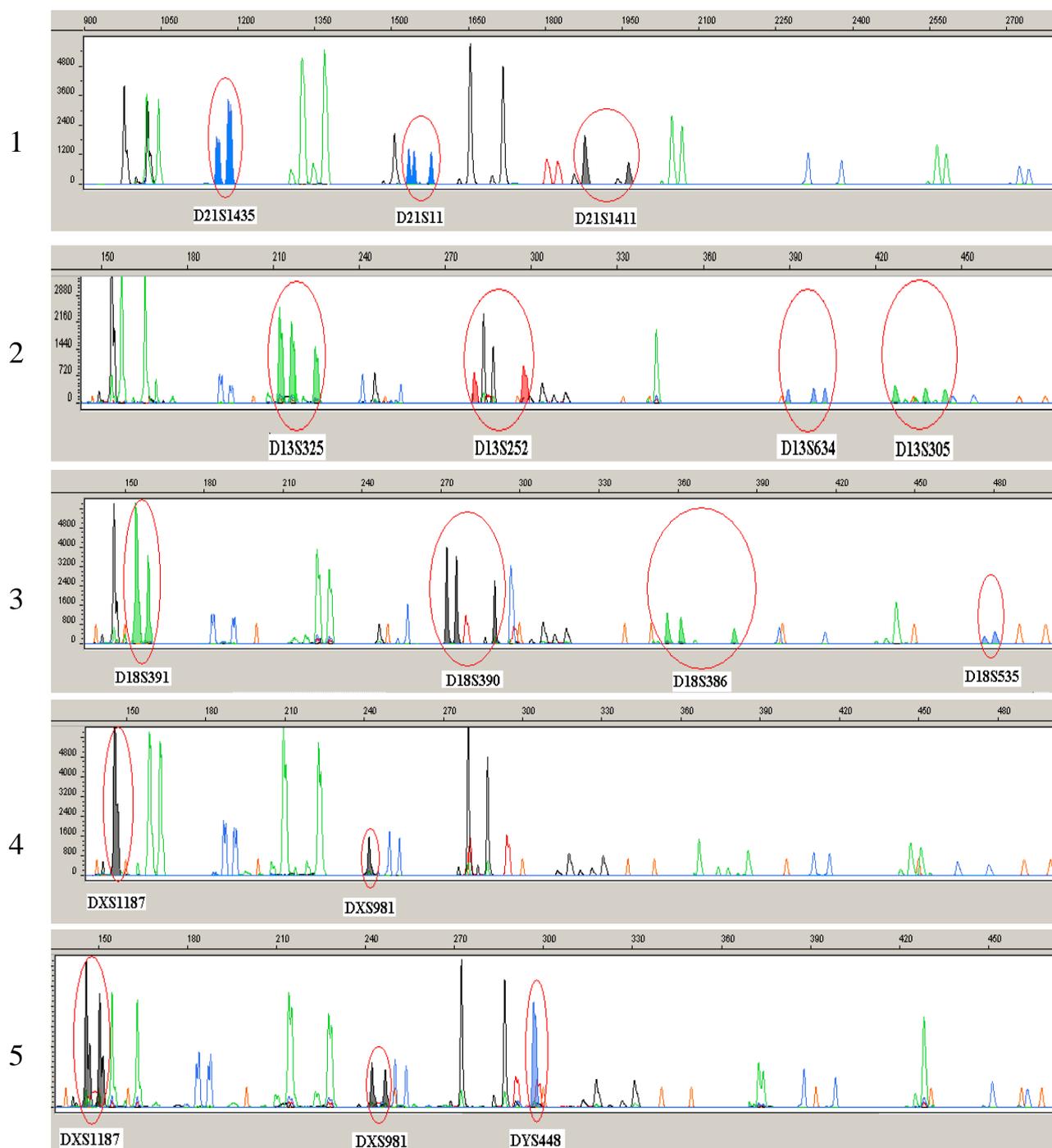


Рис. 3. Варианты электрофореграмм с различными анеуплоидиями:

- 1 – трисомия хромосомы 21 (синдром Дауна): три аллеля по маркеру D21S11, дозовый эффект по маркерам D21S1435 и D21S1411;
- 2 – трисомия хромосомы 13 (синдром Патау): три аллеля по маркерам D13S325, D13S634 и D13S305, дозовый эффект по маркеру D13S252;

3 – трисомия хромосомы 18 (синдром Эдвардса): три аллеля по маркерам D18S390, D18S386, дозовый эффект по маркерам D18S391 и D18S535;

4 – моносомия хромосомы X (синдром Шерешевского-Тернера): один аллель по маркерам DXS1187 и DXS981;

5 – дополнительная хромосома X в мужском кариотипе (синдром Клайнфельтера): два аллеля по маркерам хромосомы X (DXS1187 и DXS981) и один аллель по маркеру хромосомы Y (DYS448).

Перечень возможных осложнений или ошибок при определении анеуплоидии 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 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 лицо сотрудника должно быть защищено экраном либо маской, работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

В молекулярно-генетической 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 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.

При интерпретации результатов следует учитывать, что:

- Генетический анализатор, используемый для анализа, должен иметь аллельное разрешение 2 п.н. и функции подсчета площади под пиком/высоты пиков.

- Метод флуоресцентной количественной ПЦР может использоваться в дополнение к другим методам пренатальной диагностики. Данный метод рекомендован для тестирования хромосом

13, 18 и 21, который также можно использовать для выявления анеуплоидий по половым хромосомам, но не во всех случаях.

- Результаты анализа дают информацию о состоянии только определенного локуса, и этот метод не может заменить полный хромосомный анализ.

- Результаты, соответствующие моносомии X, когда все полиморфные маркеры содержат только один аллельный пик, и при этом отсутствуют последовательности Y-хромосомы, могут представлять случаи нормального женского генотипа, гомозиготного по всем использованным маркерам. Поэтому такие результаты должны быть подтверждены другой методикой либо интерпретированы как соответствующие моносомии X, но с вероятностью наличия у пациента нормального женского генотипа.

- Используемый метод позволяет идентифицировать увеличение или уменьшение количества хромосомного материала, но не объясняет тип перестройки хромосом.

- В случае наличия в кариотипе частичных трисомий или моносомий, возникающих в результате различных структурных перестроек, данная патология может быть не идентифицирована, если используемые маркеры не попадают в вовлеченный в перестройку локус.

- В случае наличия в кариотипе мозаицизма (двух и более клеточных клонов) регистрируемая электрофореграмма может иметь нестандартный вид и в некоторых ситуациях не получит интерпретации. Для выявления такой патологии будут требоваться другие методы исследования.