

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
23 мая 2008 г.
Регистрационный № 099-1006

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА
ЖИЛЬБЕРА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-
практический центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. К.У. Вильчук, канд. биол. наук Н.Б. Гусина,
Т.В. Васильева

Минск 2008

Синдром Жильбера является одним из наиболее распространенных наследственных нарушений обмена веществ, обуславливающих неконъюгированную гипербилирубинемия (2–12% населения). Заболевание связано с дефектом фермента билирубин-уридиндифосфоглюкуронат-глюкуронилтрансферазы (УДФГТ), который участвует в конъюгации билирубина и глюкуроновой кислоты с образованием моно- и диглюкуронидов билирубина. Заболевание выявляется преимущественно в детском или юношеском возрасте.

Наиболее часто отмечают: преходящее желтушное окрашивание склер, слизистой оболочки полости рта, кожных покровов; слабость, повышенная утомляемость; дискомфорт и незначительные боли в правом подреберье. При биохимическом исследовании крови обращает на себя внимание повышение уровня общего билирубина за счет непрямой фракции. Остальные печеночные пробы, как правило, не изменены. Повышение уровня билирубина при синдроме Жильбера провоцируется значительными физическими и психоэмоциональными нагрузками, пищевыми погрешностями, голоданием, приемом некоторых медикаментов, инфекционными заболеваниями (вирусный гепатит, грипп, ОРВИ, кишечные инфекции и др.).

Наиболее частым генетическим полиморфизмом, встречающимся у европейских пациентов с синдромом Жильбера, является ТА-инсерция в ТАТАА-блоке промотора гена UGT 1A1, названная UGT 1A1×28. Большинство пациентов является гомозиготными носителями данной мутации и имеют 7 повторов — (ТА)₇ТАА (7/7) вместо 6 — (ТА)₆ТАА (6/6). У некоторых пациентов выявлены (ТА)₅ и (ТА)₈ варианты промотора. Частота мутантного аллеля UGT 1A1×28 среди европейцев оценивается в пределах 35–40%.

Метод направлен на раннее выявление синдрома Жильбера с целью дифференциальной диагностики наследственных и ненаследственных заболеваний, сопровождающихся желтухой в детском и раннем взрослом возрасте.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-генетиков и консультантов медико-генетических центров.

Уровень внедрения: областной, республиканский.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

- программируемый нагревательный блок (амплификатор);
- генетический анализатор ABI PRISM 310;
- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл;
- микропипетки с одноразовыми наконечниками.
- Таq-полимераза 5 Ед/мкл;
- дезоксирибонуклеотиды (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) 100 ммоль/л;
- 10x Таq буфер с KCl;

- раствор MgCl₂ 25 ммоль/л;
- маркер молекулярного веса ROX350;
- деионизированный формамид;
- полимер POP-4TM;
- бидистиллированная вода.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Обследованию подлежат больные с неконъюгированной гипербилирубинемией без гемолиза. Инфекционная патология как причина желтухи должна быть предварительно исключена.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Гемолитическая анемия, инфекционный гепатит, холестатическая желтуха.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Идентификация количества ТА-повторов в промоторе гена UGT 1A1

Молекулярно-генетическая диагностика проводилась методом полимеразной цепной реакции с FAM-мечеными праймерами с разделением продуктов амплификации при помощи капиллярного гель-электрофореза.

Последовательность действий

1. Выделение геномной ДНК из лейкоцитов с помощью готовых наборов для выделения ДНК либо методом фенольно-хлороформной экстракции.

2. Для полимеразной цепной реакции использовали 1 мкл препарата ДНК: амплифицировали участок геномной ДНК, содержащий в ТАТАА-блоке промотора гена UGT 1A1. Используемые праймеры:

Gil-R 5' GTC ACG TGA CAC AGT CAA AC 3'

Gil-F (FAM)5' TTT GCT CCT GCC AGA GGT T 3'

Условия амплификации: в общем объеме амплификационной смеси, равном 20 мкл, содержалось 1 мкл (50–500 нг) геномной ДНК, 0,2 ммоль дезоксинуклеотидтрифосфатов, 2,5 ммоль MgCl₂, по 1 пмоль каждого праймера, 0,2 ед Taq полимеразы.

Амплификационная программа: 95 °С в течение 5 мин, 30 циклов со следующими параметрами: денатурация при температуре 95 °С в течение 30 с, отжиг праймеров при температуре 58 °С в течение 40 с, элонгация при 72 °С в течение 40 с. Конечная элонгация при 72 °С продолжалась 5 мин.

3. Оценка количества ТА-повторов в промоторе гена UGT 1A1 осуществлялась методом капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM 310.

Подготовка к работе генетического анализатора выполнялась в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ проб производился при следующих параметрах:

- длина капилляра 41 см;
- заполнение капилляра 4% полимером POP-4™;
- температура 60 °С;
- время инъекции образца в капилляр 6 с;
- время разделения 24 мин.

Подготовка проб:

• в пробирку добавляли 1 мкл амплификата каждой пробы, 0,7 мкл маркера молекулярного веса ROX350 и 8,5 мкл деионизированного формамида;

- пробы денатурировали 2,5 мин при 95 °С;
- охлаждали во льду;
- устанавливали микропробирки в штатив анализатора и переносили в них весь объем пробы.

Анализ проб:

- устанавливали штатив с пробями в анализатор;
- запускали программу сбора данных, предварительно задав необходимые параметры анализа в программе сбора данных;
- анализировали полученные результаты.

Интерпретация результатов

Ампликон длиной 96 п.о. соответствует участку промотора гена UGT1A1 с 7 (ТА)-повторами, что позволяет подтвердить диагноз «синдром Жильбера». Ампликон длиной 94 п.о. соответствует нормальному участку промотора гена UGT1A1 с 6 (ТА)-повторами. Наличие обоих ампликонов длиной 96 п.о. и 94 п.о. говорит о гетерозиготном носительстве 6/7 (ТА)-повторов (рис.).

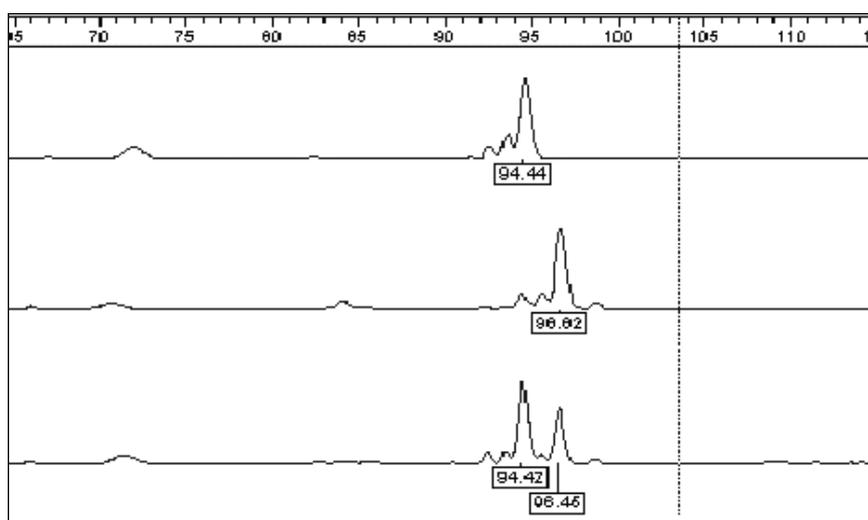


Рис. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации для детектирования количества (ТА)-повторов в промоторе гена UGT1A1

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ложно положительные результаты могут возникнуть в результате загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Устранить данные ошибки можно путем соблюдения принципов зонирования лаборатории, использования стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов, а также с помощью отрицательного контроля и повторного анализа положительных проб.

Отсутствие продуктов амплификации может наблюдаться при плохом качестве анализируемой ДНК, недостаточном или избыточном ее количестве в пробе, снижении активности Taq-полимеразы или при сбоях в работе амплификатора. Устранить данные ошибки можно при использовании высокоочищенной ДНК в количестве 100–200 нг на пробу.