

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
6 марта 2008 г.
Регистрационный № 127-1104

**БИОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ДИАГНОСТИКА ГАЛАКТОЗЕМИИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук Н.Б. Гусина, Т.В. Васильева, Е.С. Будейко

Минск 2008

Галактоземия — потенциально опасное для жизни заболевание с тяжелыми проявлениями в неонатальном периоде, вызванное недостаточностью ферментов метаболизма галактозы. Заболевание относится к группе наследственной метаболической патологии, связанной с нарушениями обмена простых углеводов.

Клинические проявления возникают после приема молока. Несвоевременное уточнение диагноза и поздно начатое лечение приводят к летальному исходу. Вовремя назначенная безгалактозная диета вызывает регрессию симптомов в течение 1–2-х недель.

Предложенная схема диагностики включает полный комплекс диагностических технологий: выявление, верификация диагноза, лабораторный мониторинг терапии, а при необходимости установление носительства и проведение пренатальной диагностики галактоземии. Часть лабораторных методов адаптирована к системе исследования сухих проб крови и мочи.

Инструкция разработана для раннего установления диагноза галактоземии с целью своевременного начала патогенетического лечения и предотвращения смертности и инвалидизации пациентов, а также медико-генетического консультирования семей с целью планирования адекватного обследования новорожденного или проведения пренатальной диагностики.

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов генетических лабораторий.

Уровень внедрения: областной, республиканский.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Гепатомегалия/гепатоспленомегалия в сочетании с проявлениями гепатоцеллюлярного некроза в неонатальном или раннеинfantильном периоде.
2. Гепатомегалия/гепатоспленомегалия в сочетании с холестатической желтухой в периоде новорожденности.
3. Гепатомегалия с твердой консистенцией печени как основным симптом у детей до 1 года.
4. Изолированная печеночная недостаточность в сочетании с *E. coli*-сепсисом, катарактой и тубулопатией в первые дни жизни.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний к применению не имеется.

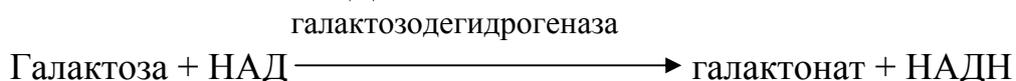
ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Биохимическая диагностика галактоземии

1. Определение галактозы и галактозо-1-фосфата в пятнах высушенной крови

Принцип метода. Галактозо-1-фосфат, содержащийся в эритроцитах, под действием фосфатазы превращается в галактозу. Суммарная галактоза

(имеющаяся в крови и образовавшаяся из галактозо-1-фосфата) под действием галактозодегидрогеназы превращается в галактонат. При этом происходит восстановление НАД:



Прирост флуоресценции образующегося НАДН пропорционален концентрациям метаболитов в пятне крови. Тест является скрининговым для оценки суммарного содержания галактозо-1-фосфата и галактозы.

Оборудование

1. Флуороскан.
2. Термостат/шейкер для микропланшетов.

Стандарты. Для получения стандартных образцов, содержащих различные концентрации галактозы и галактозо-1-фосфата, разбавляли соответствующие вещества в цельной гепаринизированной крови, освобожденной от плазмы, до концентраций: 0 мкмоль/л; 125 мкмоль/л; 250 мкмоль/л; 500 мкмоль/л; 1000 мкмоль/л; 2000 мкмоль/л.

Реактивы

1. НАД (никотинамидадениндинуклеотид), 13 ммоль/л, Mr = 663,45.
2. Галактозодегидрогеназа (GalDH), 5 мг/мл; исходную разводили в 50 раз.
3. 1 М буфер трис-HCl, pH 8,0.
4. Щелочная фосфатаза, активность 3400, для биологических исследований, исходную разводили в 100 раз.

Ход работы

1. Выбили в ячейки планшета для микротитрования стандарты галактозы и пробы крови (диаметр диска = 5 мм), начиная с A₁ в ряд по одному повтору.
2. Внесли по 100 мкл 70% C₂H₅OH для денатурации гемоглобина.
3. Денатурация и испарение этанола в течение ночи при комнатной температуре.
4. Приготовление инкубационной смеси:

а) 1 М трис-HCl, pH 8,0	33 мкл/пробу x количество ячеек;
б) 13 мМ НАД	33 мкл/пробу x количество ячеек;
в) GalDH	29,7 мкл/пробу x количество ячеек;
г) щелочная фосфатаза	3,3 мкл/пробу x количество ячеек.
5. Внесли в каждую ячейку, начиная с A₁₋₂, по 100 мкл инкубационной смеси, закрыли крышкой.
6. Перемешали на шейкере 2 мин.
7. Инкубировали в течение 1 ч при 37 °С
8. Остановили реакцию добавлением 250 мкл холодной дистиллированной воды, перемешали на шейкере.
9. Перенесли в белые измерительные микропланшеты соответственно по 250 мкл содержимого.
10. Измерение флуоресценции на флуороскане:

- фильтр возбуждения — 355 нм;
- фильтр эмиссии — 460 нм.

11. Интерпретация результатов:

- нормальные значения — 80 ± 20 мкмоль/л ($n=250$);
- при галактоземии наблюдается резкое возрастание уровня галактозо-1-фосфата и галактозы – 1400 ± 500 ($n = 18$).

2. Определение галактозо-1-фосфата, выделенного из эритроцитов

Принцип метода. Галактозо-1-фосфат, содержащийся в эритроцитах, под действием фосфатазы превращается в галактозу. Суммарная галактоза (имеющаяся в гемолизате и образовавшаяся из галактозо-1-фосфата) под действием галактозодегидрогеназы превращается в галактонат.

При этом происходит восстановление НАД:



Прирост флуоресценции образующегося НАДН пропорционален концентрациям метаболитов в пятне крови. Для оценки истинного содержания галактозо-1-фосфата из суммарной флуоресценции (колонка I) вычитают флуоресценцию, соответствующую содержанию галактозы (колонка II).

Метод используется для постановки диагноза и лабораторного мониторинга лечения галактоземии.

Подготовка образца

1. 2–3 мл гепаринизированной крови центрифугировали (2000 об./мин) в течение 5 мин при 4 °С.
2. Плазма удалялась, осажденные эритроциты ресуспендировали в 3 объемах холодного 0,9% раствора NaCl.
3. Центрифугировали описанным выше способом, супернатант удаляли, отмывку повторяли 3 раза.
4. Центрифугировали (4500 об./мин) в течение 10 мин при 4 °С.
5. Точно измеряли объем эритроцитов и добавляли 3 объема холодной воды.
6. Клетки ресуспендировали стеклянной палочкой до тех пор, пока смесь не стала прозрачной.
7. Смесь депротеинизировали в кипящей водяной бане в течение 3 мин с постоянным круговым перемешиванием пробирки.
8. Охладили на льду.
9. Центрифугировали (4500 об./мин) в течение 10 мин при 4 °С.
10. Супернатант перенесли в другую пробирку для последующего определения галактозо-1-фосфата.

Оборудование

1. Флуороскан.

Реактивы

1. НАД (никотинамидадениндинуклеотид), 13 ммоль/л, $M_r = 663,45$.

2. β-галактозодегидрогеназа (GalDH, 5 мг/1 мл, специфическая активность — 5 U/мг белка).

3. Щелочная фосфатаза, 1500 U.

4. 0,2 М буфер трис-HCl, pH 8,6 + 1 мМ MgCl.

5. Галактозо-1-фосфат, 30 мкг/мл (стандарт).

Ход работы

1. Пробы и стандарты вносили в белые измерительные планшеты в следующем порядке:

A	Проба 1	Проба 1
B	Проба 1	Проба 1
C	Проба 2	Проба 2
D	Проба 2	Проба 2
E	—	—
F	—	—
G	Стандарт	
H	Стандарт	
	I колонка	II колонка

2. Внесли по 270 мкл буфера в обе колонки.

3. Добавили по 3,6 мкл GalDH в обе колонки.

4. Добавили по 3,6 мкл щелочной фосфатазы в I колонку.

5. Добавили по 3,6 мкл бидистиллированной воды в II колонку.

6. Добавили по 91 мкл соответствующих проб.

7. Добавили по 91 мкл стандартного раствора из разведения 990 мкл воды + 10 мкл исходного раствора.

8. Внесли по 4,5 мкл НАД во все колонки.

9. Измерили флюоресценцию F_0 .

10. Перемешали и оставили при комнатной температуре на 1 ч.

11. Измерили флюоресценцию F_1 .

12. Расчет:

$$\frac{(AF_1 - AF_0) - (BF_1 - BF_0)}{StF_1 - StF_0} \times 30 \times 4 = \text{мкг/мл осажденных клеток,}$$

где AF — флюоресценция пробы в колонке A; BF — флюоресценция пробы в колонке B; StF — флюоресценция стандартов.

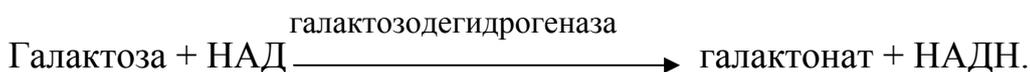
12. Интерпретация результатов:

- нормальные значения — $3 \pm 1,5$ мкг/мл осажденных клеток ($n = 65$);
- при галактоземии наблюдается резкое возрастание содержания галактозо-1-фосфата в эритроцитах — $99,9 \pm 23$ ($n = 18$).

3. Определение галактозы в сыворотке и цельной крови

Принцип метода. Галактоза под действием галактозодегидрогеназы превращается в галактонат.

При этом происходит восстановление НАД:



Прирост оптической плотности при 340 нм пропорционален концентрациям галактозы в крови.

Оборудование

1. Мультискан или любой другой микропланшетный ридер с фильтром 340 нм.

Реактивы

1. Фосфатный буфер, рН 8,0.
2. НАД, 13 ммоль/л.
3. GalDH, 5 U/мг.
4. Хлорная кислота, 10,33 ммоль/л.

Подготовка образца

1. Депротеинизировали собранную кровь.
2. Внесли по 1 мл пробы в пробирки для центрифугирования, добавили к каждой пробе 0,1 мл хлорной кислоты.
3. Перемешали и использовали 0,2 мл супернатанта для исследований.

Ход работы

1. Внесли в ячейку микропланшета (длина оптического пути 1 см) — 0,3 мл фосфатного буфера; 0,01 мл НАД; 0,02 мл депротеинизированного супернатанта.

2. Перемешали на шейкере, измерили поглощение A_1 (340 нм).
3. Добавили 0,002 мл GalDH.
4. Перемешали и оставили на 30–40 мин.
5. Измерили поглощение A_2 .
6. Подсчет: $\Delta A = A_2 - A_1$

- концентрация галактозы C (ммоль/л) = $15,4 \times \Delta A$;
- концентрация галактозы C (мг/100 мл) = $278 \times \Delta A$.

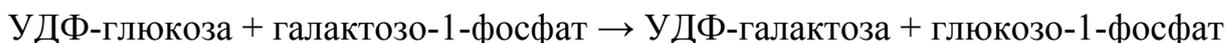
7. Интерпретация результатов:

- нормальные значения — $0,240 \pm 0,050$ (n=250) моль/л;
- значения при галактоземии – $4,72 \pm 1,53$ ммоль/л (n =20).

4. Определение активности галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы

Принцип метода. В основе данного метода лежит проба на потребление УДФ-глюкозы.

Реакция, катализируемая галактозо-1-фосфатуридилтрансферазой:



Гемолизат инкубируется на некоторое время с УДФ-глюкозой и галактозо-1-фосфатом. Реакция останавливается, затем количество расходуемой УДФ-галактозы определяется путем сравнения количества УДФ-глюкозы в пробе и в аналогичной смеси, в которую не добавляли галактозо-1-фосфат.

Метод используется для подтверждения диагноза и установления носительства галактоземии.

Оборудование

1. Мультискан или любой другой микропланшетный ридер с фильтром 340 нм.

Реактивы:

1. Уридиндифосфоглюкоза (UDPG), 10,5 ммоль/л.
2. Галактозо-1-фосфат, 8 ммоль/л.
3. НАД, 12,5 мг/1 мл.
4. Глициновый буфер, 1 М, pH 8,7.
5. Уридиндифосфоглюкозодегидрогеназа (UDPG-DH), 0,3–0,6 У/мг белка.
6. NaCl, 0,85 w/v.

Обработка образца

1. 2–4 мл гепаринизированной крови сразу же разделили на 2 пробирки и поместили на лед.
2. Центрифугировали при 4 °С в течение 15 мин (2000 об./мин). Плазму удалили.
3. Отмыли эритроциты двумя объемами холодного физиологического раствора.
4. Центрифугировали 15 мин (2000 об./мин) при 4 °С, супернатант слили.
5. Отмывку эритроцитов повторили дважды.
6. Добавили один объем холодной дистиллированной воды к клеткам и с помощью стеклянной палочки разрушили эритроциты (раствор стал прозрачным).
7. Определили концентрацию гемоглобина в гемолизате.
8. Поместили оставшийся гемолизат на водяную баню (37 °С) на 10 мин для инактивации эндогенного НАД и эпимеразы.

Ход работы

1. Внесли в стеклянные пробирки для центрифугирования 0,4 мл глицинового буфера и 0,1 мл раствора UDPG, хорошо перемешали.
2. Подготовили две пробирки следующим образом:
 - а) пробирка 1 (test) — 0,1 мл смеси глицинового буфера и UDPG, 0,05 мл галактозо-1-фосфата;
 - б) пробирка 2 (blank) — 0,1 мл смеси глицинового буфера и UDPG, 0,05 мл воды.
3. Поместили пробирки на водяную баню (37 °С) на 10 мин.
4. Добавили по 0,1 мл гемолизата к пробиркам 1 и 2, хорошо перемешали, инкубировали в течение 15 мин.
5. Добавили 0,5 мл NaCl в каждую пробирку и поместили все пробирки в кипящую водяную баню на 2 мин с постоянным круговым перемешиванием.
6. Поместили пробирки на лед на 5 мин.
7. Центрифугировали при 4500 об./мин в течение 10–15 мин до получения чистого супернатанта.
8. Внесли в микрокювету № 1 0,2 мл супернатанта из пробирки 1 (test), в микрокювету № 2 — 0,2 мл супернатанта из пробирки 2 (blank).

9. Добавили в каждую кювету:

- а) 0,15 мл глицинового буфера;
- б) 0,1 мл раствора НАД;
- в) 0,45 мл воды.

10. Только в кювету № 1 добавили 0,1 мл раствора UDPG-DH, закрыли парафином, перемешали перевертыванием.

11. Снимали показания при 340 нм против воды через 0,5; 1; 1,5 и 2 мин. Продолжали снимать показания с интервалом 4 мин на протяжении 30 мин. Когда изменение абсорбции стало меньше, чем 0,02 в интервале 4 мин, реакция закончилась.

12. Добавили 0,1 мл раствора UDPG-DH в кювету № 2, сняли показания так же, как и для кюветы № 1.

13. Построили кривую по показаниям для каждой кюветы, включая 0. Подсчитали увеличение абсорбции для каждой кюветы от 0 до максимальной абсорбции.

14. Расчет:

$$\frac{A_{Blank} - A_{Sample}}{C_{Hb}(\text{г/мл})} \times 12,1 = \text{ед. активности/г Hb,}$$

где A_{Blank} — абсорбция смеси, A_{Sample} — абсорбция пробы, C_{Hb} — концентрация гемоглобина.

15. Интерпретация результатов:

- область нормальных значений — 18 ± 3 Ед/г Hb ($n = 54$);
- при галактоземии — $0,95 \pm 0,55$ ($n = 20$).

5. Молекулярно-генетическая диагностика

Молекулярная диагностика галактоземии проводилась с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В основе метода ПЦР как инструмента лабораторной диагностики лежит обнаружение последовательности ДНК, специфичной только для данной мутации, с использованием данной реакции для накопления искомого фрагмента.

Методика проведения анализа с использованием метода ПЦР включает три этапа:

1. Выделение ДНК из клинического образца.
2. Амплификация специфических фрагментов ДНК.
3. Детекция продуктов амплификации.

Подготовка пробы

Подготовка пробы состояла в выделении лейкоцитов из цельной гепаринизированной крови, из которых затем методом фенольно-хлороформной экстракции выделяли ДНК.

Выделение лейкоцитов:

1. К 5 мл гепаринизированной крови добавили 40 мл лизирующего буфера, тщательно перемешали и оставили на 20 мин на ледяной бане.
2. Центрифугировали при 2000 об./мин в течение 5 мин.

3. Удалили супернатант, добавили 5 мл холодного лизирующего буфера и оставили на 10 минут на ледяной бане.

4. Добавили 45 мл физиологического раствора, тщательно перемешали.

5. Центрифугировали при 2000 об./мин в течение 5 мин.

6. Удалили супернатант, добавили 1,5 мл физиологического раствора и тщательно перемешали.

7. Центрифугировали при 4000 об./мин в течение 10 мин.

8. Удалили супернатант, лейкоциты использовали для выделения ДНК.

Выделение ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции:

1. К выделенным стандартным методом лейкоцитам добавили 0,1 объема 10% SDS (додецилсульфат натрия) и протеиназу К до конечной концентрации 1 мг/мл.

2. Ингредиенты тщательно перемешали и инкубировали в течение ночи при 37 °С.

3. К полученной смеси добавили 0,5 объема фенола и 0,5 объема смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в пропорции 24:1. Компоненты медленно перемешали переворачиванием пробирок в течение 2 мин.

4. Центрифугировали 6 мин при 6 000 об./мин.

5. Верхнюю фазу собрали в пробирки, добавили 0,5 объема фенола и 0,5 объема смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в пропорции 24:1.

6. Центрифугировали 6 мин при 6 000 об./мин.

7. Верхнюю фазу собрали в чистые пробирки, добавили 0,1 объема ацетата натрия (рН 5,2) и 3 объема 96% этанола.

8. Видимый высокомолекулярный сгусток ДНК перенесли в другую пробирку, промыли в 500 мкл 70% этанола, этанол слили.

9. ДНК высушили и растворили в 200 мкл дистиллированной воды.

Оборудование

Программируемый нагревательный блок (амплификатор), камера для вертикального электрофореза, источник постоянного тока, UV трансиллюминатор, камера для фотографирования гелей, микропипетки.

Реактивы

1. Амплификационный буфер x10.

2. MgCl₂, 50 mM.

3. Дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ), 2 mM.

4. Полимераза Taq Gold, 5 U/мкл.

5. Праймеры, 10 пМ:

Gal-1	—	5' GGGTCGACGTCGGATGTAACGCTGCCACTCA 3'
Gal-2	—	5' GGGGACACAGGGCTTGGCTCTCTCCCA 3'
N314D-1	—	5' GGGTCGACGAGATGCTGGGACTGAGGGTGGAGCA 3'
N314D-2	—	5' GGGGTCGACGCCTGCACATACTGCATGTGA 3'
K285N-1	—	5' TGGGGCTAGGCACTGGATGGA 3'
K285N-2	—	5' AGGACGTCTCAAAGAGGTTGTCGTA 3'

Определение мутаций гена GALT:

1. Для детекции мутации Q188R и N314D осуществлялась амплификация участков VI и X экзонов гена GALT соответственно; для определения мутации K285N — амплификация экзона IX. ПЦР проводилась в объеме 20 мкл, содержащем:

Буфер x10	—	2 мкл/пробу
MgCl ₂	—	0,5 мкл/пробу
Праймеры	—	по 1 мкл/пробу
Полимераза Taq Gold	—	0,5 мкл/пробу
дНТФ	—	2 мкл/пробу

Для определения мутации Q188R использовали пару праймеров Q188R-1 и Q188R-2, для определения мутации N314D: N314D-1 и N314D-2, для мутации K285N: K285N-1 и K285N-2.

2. Добавили по 300 нг геномной ДНК, довели объем смеси до 20 мкл дистиллированной водой, тщательно перемешали.

3. Поместили амплификационные пробирки в амплификатор (PTC-200, MJ Research) и провели начальную денатурацию ДНК при 94 °С в течение 7 мин.

Для дальнейшей амплификации были созданы следующие условия:

- цикл 1–32: денатурация — 45 с при 94 °С, отжиг — 1 мин при 60 °С, синтез цепи — 1 мин при 72 °С;

- цикл 33: денатурация — 45 с при 94 °С, отжиг — 1 мин при 60 °С, синтез цепи — 5 мин при 72 °С; охладили до 4 °С.

4. Для определения мутации Q188R продукты амплификации инкубировались в течение 12 ч при 37 °С с рестрикционной смесью, содержащей:

- рестриктазу HPA II — 5 U/пробу;
- рестрикционный буфер L, 10x — 2,2 мкл/пробу.

Для определения мутации N314D продукты амплификации инкубировались в течение 12 ч при 45 °С с рестрикционной смесью, содержащей:

- рестриктазу Sin I — 10 U/пробу;
- буфер A, 10x — 2,5 мкл/пробу;
- БСА — 0,25 мкл/пробу.

Объем смеси довели дистиллированной водой до 5 мкл.

Для определения мутации K285N продукты амплификации инкубировались в течение 12 ч при 37 °С с рестрикционной смесью, содержащей:

- рестриктазу RSA I — 10 U/пробу;
- рестрикционный буфер 10x — 2,3 мкл/пробу.

Интерпретация результатов

При поиске мутации Q188R у больных галактоземией и в их семьях использовался метод, основанный на амплификации, рестрикции эндонуклеазами и электрофоретическом разделении фрагментов. Посадка праймеров показана на рис. 3. Мутация Q188R создает новый сайт рестрикции в шестом экзоне для эндонуклеазы Hpa II (рис. 1, 2).

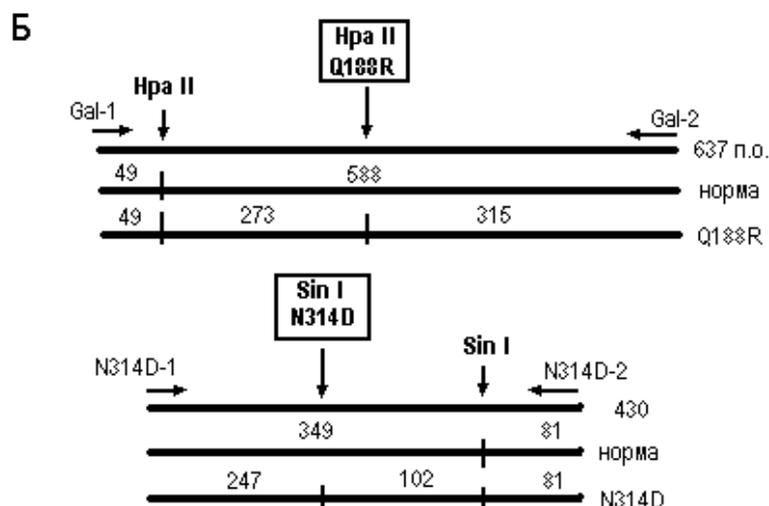


Рис. 1. ПЦР-амплификация и рестрикция эндонуклеазами фрагмента генома, содержащего мутацию Q188R и N314D: вертикальные стрелки — сайты рестрикции, горизонтальные — посадка праймеров

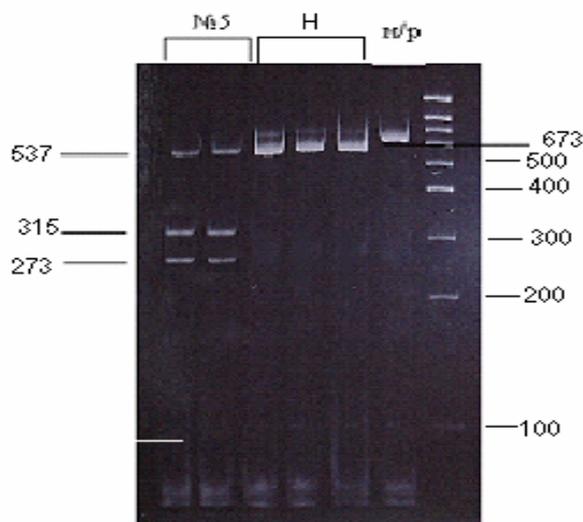


Рис. 2. Мутантный аллель Q188R в пробе от пациента, гетерозиготного носителя: Н — норма, отсутствие мутации; н/р — неразрезанные продукты амплификации

Неразрезанные продукты амплификации для поиска мутации Q188R имели размер 637 п.о.; после рестрикции эндонуклеазой Hpa II при наличии мутантного аллеля эти фрагменты разрезались на более короткие куски; один из них являлся конститутивным (49 п.о.), так как присутствовал после разрезания и в нормальной, и в мутантной последовательностях, другие

являлись диагностическими на присутствие (273 п.о. и 315 п.о.) или отсутствие (588 п.о.) мутации.

Амплификация и рестрикция эндонуклеазами фрагмента генома, содержащего мутацию K285N, показана на рис. 3, 4.



Рис. 3. ПЦР-амплификация и рестрикция эндонуклеазами фрагмента генома, содержащего мутацию K285N: вертикальная стрелка — сайт рестрикции

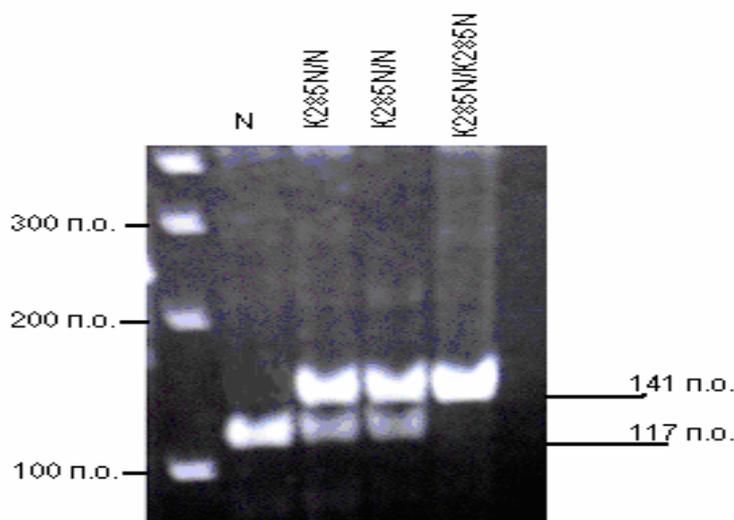


Рис. 4. Мутантный аллель K285N в пробах от пациентов:
N — норма, отсутствие мутации, K285N/N — гетерозиготное носительство мутации, K285N/ K285N — гомозиготное носительство мутации

Неразрезанные продукты амплификации для поиска мутации K285N имели размер 141 п.о., после рестрикции эндонуклеазой Rsa I при наличии нормального аллеля эти фрагменты разрезались на куски 117 п.о. и 24 п.о. Отсутствие рестрикции указывало на наличие мутации.

Современные подходы к лабораторной диагностике галактоземии представляют собой сочетание биохимических и молекулярно-генетических технологий, взаимно дополняющих друг друга. Такое сочетание позволяет успешно решить все задачи, связанные с прижизненной и пренатальной диагностикой, прогнозированием тяжести течения и успешности лечения заболевания, выявлением гетерозиготных носителей, адекватным лабораторным мониторингом лечения.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Представлен в таблице.

Таблица 1

Возможные ошибки и затруднения при применении молекулярно-генетических методов диагностики галактоземии

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложноположительные/ложноотрицательные результаты	1. Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом	Соблюдение принципов зонирования лаборатории для проведения молекулярно-генетических исследований Использование стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов Отрицательный контроль (пробы, не содержащей ДНК) в каждой серии исследований Проведение повторного анализа положительных проб
	2. Снижение (утрата) активности рестриктаз	Использование контрольных образцов ДНК (с известной последовательностью нуклеотидов)