

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
20.12.2012

Регистрационный № 160-1112

**ТЕХНОЛОГИЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОДЕЛЕЦИЙ AZF-ЛОКУСА
ХРОМОСОМЫ Y С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФРАГМЕНТНОГО
ДНК-АНАЛИЗА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН
Беларуси», ГУ «Республиканский научно-практический центр “Мать и дитя”»

АВТОРЫ: канд. биол. наук П.М. Морозик, д-р биол. наук И.Б. Моссэ, канд. биол.
наук Т.В. Осадчук

Минск 2012

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлена технология идентификации микроделечий трех регионов длинного плеча Y-хромосомы: AZFa, AZFb и AZFc, которые встречаются с частотой примерно 1 на 1000-1500 мужчин, и являются одной из наиболее частых генетических причин тяжелых форм нарушения сперматогенеза.

Метод относится к медицинской генетике. Уровень внедрения: ГУ РНЦ «Мать и дитя», иные медико-генетические центры.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Биологический материал

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, а также небольшие фрагменты пятен крови, высушенных на специальных бланках.

Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР).

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 mM MgCl₂;
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP);
- праймеры, фланкирующие участок, содержащий анализируемую или контрольную последовательность ДНК (таблица 1);
- бидистиллированная деионизированная вода (H₂O).

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

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показано мужчинам с азооспермией или олигозооспермией тяжелой степени для установления причины нарушения сперматогенеза, в том числе и в программах ЭКО.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Проведение автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием

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 маркеров хромосомы Y, отобранных для исследования локуса AZF

Маркер	Область локализации	Размер (п.н.)	Концентрация	Последовательность праймеров	Метка
sY86	AZF-a	319	10 pM	GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC	FAM
			10 pM	ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT	
sY127	AZF-b	270	5 pM	GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA	FAM
			5 pM	CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA	
sY254	AZF-c	123	5 pM	GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA	FAM
			5 pM	GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C	
sY84	AZF-a	327	5 pM	AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT	FAM
			5 pM	GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC	
sY134	AZF-b	304	2,5 pM	GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG	FAM
			2,5 pM	ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA	
sY255	AZF-c	377	4 pM	GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT	FAM
			4 pM	CTC GTC ATG TGC AGC CAC	
ZFY		500	5 pM	ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C	FAM
			5 pM	GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T	
SRY		490	15 pM	GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA	FAM
			15 pM	GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG	

Методика тестирования маркеров AZF-локуса хромосомы Y

Проведение ПЦР

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1x ПЦР-буфер, 2,5 mM MgCl₂, 200 мкM dATP/dCTP/dTTP/dGTP, от 1,5 до 5 pM 15 пар праймеров и 0,75 единиц активности Taq-полимеразы.

2. В пробирки для ПЦР внести по 19,5 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.

3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 мин при 94°C. Затем выполняется 28 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 выполнить в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ проводить при следующих параметрах:

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

Подготовка проб:

1. В пробирку добавить 1 мкл амплификата из каждой реакции, 0.8 мкл маркера молекулярного веса и 8 мкл деионизированного формамида.

2. Пробы денатурировать 4 мин при 95°C.

3. После денатурации пробирки с пробами быстро охладить во льду.

4. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.

5. Перенести весь объем пробы в микропробирки.

Анализ проб:

1. Установить штатив с микропробирками в анализатор.

2. Задать необходимые параметры анализа в программе сбора данных.

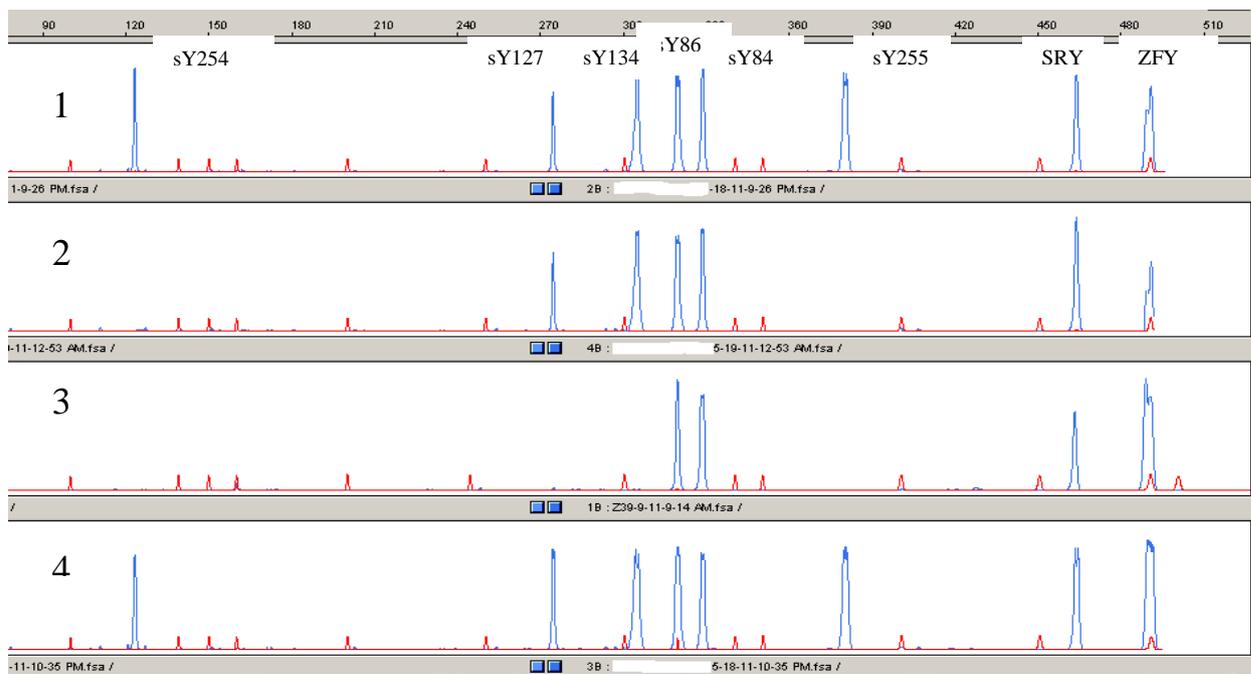
3. Запустить программу сбора данных.

4. После окончания разделения образцов и сбора данных перенести результаты в программу анализа данных.

5. Проанализировать полученные данные.

Интерпретация полученных данных и критерии определения микроделеций AZF-локуса хромосомы Y

Полученные данные анализируют, определяя количество маркеров на электрофореграмме. Идентификация микроделеций одного или нескольких локусов хромосомы Y определяется по отсутствию продуктов амплификации соответствующих маркеров, как показано на рисунке.



1, 4 — нормальные образцы; 2 — образец с делецией локуса AZFc; 3 — образец с делецией локуса AZFb+c.

Рисунок 1 — Электрофоретический анализ маркеров хромосомы Y

Варианты микроделечий и критерии их определения по результатам фрагментного ДНК-анализа приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Критерии определения микроделечий хромосомы Y по результатам фрагментного ДНК-анализа.

Варианты микроделечий	Отсутствующие на электрофореграмме маркеры	Наблюдаемые на электрофореграмме маркеры
AZFc	sY254, sY255	sY84, sY86, sY127, sY134, SRY, ZFY
AZFb	sY127, sY134	sY84, sY86, sY254, sY255, SRY, ZFY
AZFb+c	sY254, sY255, sY127, sY134	sY84, sY86, SRY, ZFY
AZFa	sY84, sY86	sY127, sY134, SRY, ZFY
AZFa+b+c	sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255	SRY, ZFY
Нормальный генотип	нет	sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, SRY, ZFY

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ 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, желательнее, 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 работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них биологического 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 подготовку образцов, электрофорез и регистрацию результатов.