

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Е.Л.Богдан  
«18» *август* 2021 г.  
Регистрационный № 166-1220

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕРМИНАЛЬНОЙ МУТАЦИИ**

**2282del4 ГЕНА FLG**

(инструкция по применению)

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:** государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и  
экологии человека»

**АВТОРЫ:** к.б.н., доцент Силин А.Е., к.м.н. Зыблева С.В., к.б.н., доцент  
Мартинков В.Н., Силина А.А., к.б.н., доцент Воропаева А.В.

Гомель, 2020

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Е. Л. Богдан  
28.01.2021  
Регистрационный № 166-1220

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕРМИНАЛЬНОЙ МУТАЦИИ  
2282del4 ГЕНА FLG**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доц. А. Е. Силин, канд. мед. наук С. В. Зыблева, канд.  
биол. наук, доц. В. Н. Мартинков, А. А. Силина, канд. биол. наук, доц.  
А. В. Воропаева

Гомель 2020

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод молекулярно-генетического анализа герминальной мутации 2282del4 гена, кодирующего филаггрин (FLG) посредством аллельспецифической полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику atopического дерматита. Инструкция предназначена для врачей-иммунологов, врачей-аллергологов, врачей-генетиков, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с atopическим дерматитом в стационарных и амбулаторных условиях.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

Высокоскоростная микроцентрифуга (до 10000-12000×g) с ротором для пробирок типа «эпендорф» (1,5 мл); твердотельный термостат; микроцентрифуга-вортекс; комплект пипеточных дозаторов (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл); насос с колбой-ловушкой; ПЦР-бокс с ультрафиолетовым рециркулятором воздуха; спектрофотометр для определения количества и качества выделенной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК); амплификатор ДНК; камера для горизонтального агарозного гель-электрофореза; источник питания с постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 200V; УФ-трансиллюминатор с фотокамерой для съемки в ультрафиолетовом свете.

Набор расходных материалов: резиновые перчатки; халаты; наконечники для пипеток с фильтром (до 10, 20, 200, 1000 мкл); фильтровальная бумага; микроцентрифужные пробирки (1,5 и 2 мл); пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) для забора крови; ПЦР-пробирки (0,2 мл); штативы для пробирок (1,5 и 0,2 мл); стеклянная химическая посуда и др.

Набор реагентов для пробоподготовки и ПЦР включает в себя следующие компоненты: готовый коммерческий набор для экстракции ДНК из крови; буферный раствор для ПЦР; термостабильная ДНК-полимераза для «горячего старта» (Hot-start Taq-полимераза); 25 мМ MgCl<sub>2</sub>; смесь нуклеотидтрифосфатов специфические олигонуклеотидные праймеры 10 мМ раствор; вода ПЦР-качества; компоненты для приготовления агарозного геля, буферных растворов для электрофореза; реагенты для окраски ДНК бромистым этидием.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Заболевание или патологическое состояния, характеризующееся наличием не менее 3-х главных критериев, а также 3-х и более дополнительных, при минимальном сроке сохранения симптомов не менее 6 недель.

*Главные диагностические критерии:*

кожный зуд;

типичная морфология (основной первичный элемент — папула/везикула + вторичные элементы) и локализация поражений кожи: у детей в первые годы жизни — высыпания на лице и разгибательных поверхностях конечностей,

у более старших детей и у взрослых — лихенификация и расчесы в области сгибов конечностей;

хроническое рецидивирующее течение;

начало заболевания в раннем детском возрасте (до 2-х лет);

атопия в анамнезе или наследственная предрасположенность к атопии.

*Дополнительные диагностические критерии:*

ксероз;

ихтиоз/усиление рисунка на ладонях;

реакции немедленного типа при кожном тестировании с аллергенами;

повышенный уровень сывороточного IgE;

эозинофилия в крови;

частые инфекционные поражения кожи, в основном стафилококковой, грибковой и герпетической этиологии, связанные с ослаблением клеточного иммунитета;

локализация кожного процесса на кистях и стопах;

рецидивирующие конъюнктивиты;

дополнительные суборбитальные складки Денни–Моргана;

периорбитальная гиперпигментация, темные круги под глазами;

катаракта, кератоконус;

эритродермия;

белый дермографизм.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **1. Материал для исследования и пробоподготовка**

Материалом для выделения ДНК с целью анализа герминальной мутации 2282del4 гена FLG является цельная венозная кровь. Материал объемом 1 мл после забора переносится в центрифужную пробирку типа «эппендорф» объемом 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5 М ЭДТА (финальная концентрация 50 мМ). Выделение и очистка образцов ДНК осуществляется обычным доступным способом посредством соответствующих наборов реагентов.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение проводится при температуре -20 °С.

### **2. Полимеразная цепная реакция**

#### **2.1. Специфические олигонуклеотидные праймеры**

Анализ мутации 2282del4 гена FLG осуществляется в пределах 3 экзона гена FLG посредством аллельспецифической ПЦР. Для ее тестирования используются четыре олигонуклеотидных праймера (таблица 1). Для ПЦР используются одновременно все четыре праймера. Пара праймеров 2282del4\_contr\_F и 2282del4\_contr\_R в результате ПЦР продуцируют фрагмент 207 пары нуклеотидов (п.н.), который должен выявляться при каждом тестировании в качестве внутреннего контроля, позволяющего оценить качество

проведенной реакции. Пара праймеров 2282del4\_mut\_F и 2282del4\_mut\_R служат для проведения аллельспецифической реакции в случае присутствия в генотипе тестируемого пациента мутации 2282del4 гена FLG. Данные праймеры в результате ПЦР продуцируют фрагмент 158 п.н.

Таблица 1. — Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР

Ген	Мутация	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, п.н.
FLG	2282del4	2282del4_mut_F	AGAAGACTCAGACACACATTG	158
		2282del4_mut_R	GGGAGGACTCAGACTGTTT	
		2282del4_contr_F	ATTCTTTGTCCCTGGCAGT	207
		2282del4_contr_R	GACAGTTCSCAAATGACAAGT	

## 2.2. Условия проведения полимеразной цепной реакции

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР буфер (200 мМ Трис-НСl рН 8,3, 200 мМ КСl, 50 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 мкл 10 мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 1,25 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5 ед./мкл), 3 мкл образца ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. Для ПЦР необходимо использовать специальные пробирки объемом 0,2 мл. ПЦР проводится в амплификаторе с подогреваемой крышкой.

Программа для амплификации всех анализируемых фрагментов ДНК выглядит следующим образом: начальная денатурация (3 мин при 95 °С), затем 35 циклов (10 с денатурации при 95 °С), отжиг праймеров (10 с при 55 °С) и элонгация (20 с при 72 °С). В завершении — финальная элонгация (5 мин при 72 °С) и охлаждение (до 4 °С).

## 3. Электрофоретическая детекция результатов ПЦР

### 3.1. Подготовка геля и буферных растворов

Детекция результатов амплификации осуществляется посредством агарозного гель-электрофореза и окраской бромистым этидием в электрофоретической камере для горизонтального агарозного гель-электрофореза.

Для электрофоретического анализа необходимо приготовление четырех основных растворов реагентов. Для удобства использования изначально готовят концентрированные (стоковые) растворы, из которых затем путем добавления дистиллированной и деионизированной воды формируют рабочие растворы.

Таблица 2. — Подготовка стокового раствора 0,5 М EDTA, рН = 8,0

Реагенты	Конц.	На 100 мл
EDTA	0,5 М	18,62 г
NaOH	~0,5 М	2,028 г
H <sub>2</sub> O		88,95 мл

EDTA не растворяется в воде при кислом рН, поэтому при растворении нужно добавлять щелочь и контролировать рН. Хранить раствор нужно при 4 °С.

Таблица 3. — Подготовка трис-ЭДТА-боратного стокового раствора (20×)

Реагенты	Конц. 1×	Конц. 20×	Сток	На 500 мл
Трис	89 мМ	1,78 М	121,14 г/М	107,8 г
Борная кислота	89 мМ	1,78 М	61,83 г/М	55,03 г
EDTA 0,5М, рН 8,0	2 мМ	40 мМ	500 мМ	40 мл
H <sub>2</sub> O				863,3 мл

Рабочий раствор 1× трис-ЭДТА-боратный буфер (ТБЕ буфер) готовят путем разведения 50 мл стокового раствора буфера (20×) до объема 1 л дистиллированной водой. Затем добавляют 50 мкл стокового раствора бромистого этидия (1 %).

Таблица 4. — Подготовка стокового раствора бромистого этидия 10 мг/мл (1 %)

Реагенты	На 10 мл
Бромистый этидий	0,1 г
H <sub>2</sub> O	до 10 мл

Таблица 5. — Подготовка стокового (4×) загрузочного буфера для образцов

Реагенты	Конц.(%)	На 40 мл
Бромфеноловый синий 2 %	0,05	1 мл
Глицерин 100 %	70	28 мл
H <sub>2</sub> O		11 мл

Для проведения электрофореза также могут быть использованы готовые коммерческие наборы для электрофоретического фракционирования ДНК с последующей окраской бромистым этидием.

### 3.2. Проведение электрофореза

Электрофорез проводится в стандартной камере для горизонтального агарозного электрофореза.

3.2.1. Агарозу для электрофореза в количестве 1,7 г поместить в термостойкую стеклянную колбу на 250 мл. Добавить 100 мл рабочего раствора 1× ТБЕ буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного расплавления агарозы (2 мин).

3.2.2. Залить расплавленную агарозу в специальную форму и установить гребенки в пазы на кювете.

3.2.3. Через 20 мин после полной полимеризации геля извлечь гребенки не повреждая лунки. Поместить кювету с гелем в камеру для электрофореза. Залить в камеру для электрофореза рабочий раствор 1× ТБЕ буфера так, чтобы слой буфера на 5 мм покрывал гель.

3.2.4. Добавить к каждому образцу (25 мкл амплификационной смеси) по 8 мкл 4× загрузочного буфера. Перемешать пипетированием.

3.2.5. Через слой буфера в отдельные лунки внести пипеточным дозатором по 10 мкл смеси ампликонов и загрузочного буфера, положительный, отрицательный контроли и маркер молекулярного веса.

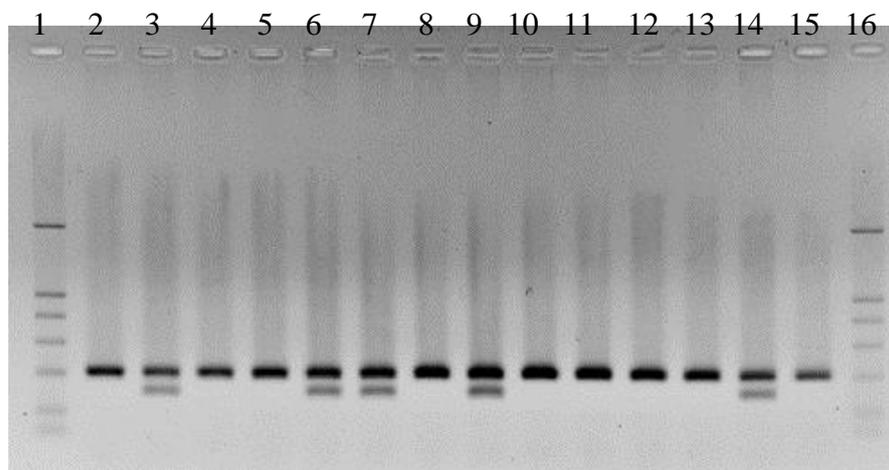
3.2.6. Закрывать электрофоретическую камеру защитной крышкой и подключить электрофоретическую камеру к источнику питания, соблюдая полярность подключения.

3.2.7. Электрофорез проводить при 170 В в течение 40 мин.

3.2.8. Результаты электрофоретического фракционирования зарегистрировать визуально посредством любого оборудования, предназначенного для просмотра электрофоретических гелей, окрашенных бромистым этидием, в УФ свете.

#### 4. Интерпретация результатов анализа

Результат тестирования признается положительным в случае наличия на электрофореграмме дополнительной фракции, соответствующей по молекулярному весу аллельспецифическому фрагменту (158 п.н.). Примеры электрофоретической детекции мутации 2282del4 гена FLG представлены на рисунке. Для лучшей визуализации изображение представлено в инвертированном виде.



дорожки 2, 4, 5, 8, 10-13 и 16 — образцы с нормальной последовательностью ДНК;  
дорожки 3, 6, 7, 9 и 14 — образцы, содержащие мутацию 2282del4 гена FLG;  
дорожки 1 и 16 — маркер молекулярного веса (50, 100, 200, 300, 400, 500 и 1000 п.н.)

**Рисунок — Электрофоретическая детекция герминальной мутации 2282del4 гена FLG методом аллельспецифической полимеразной цепной реакции в 1,7 % агарозном геле**

Эта информация используется врачом-аллергологом в комплексе с данными клинических, лабораторных и инструментальных видов исследований для персонализированного подхода к лечению и медицинской профилактике аллергических заболеваний.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

В процессе молекулярно-генетического анализа наиболее распространенным признаком методических нарушений является слабая

амплификация исследуемых фрагментов ДНК либо ее отсутствие. Это проявляется в виде нечетких фракций либо в их отсутствии после окраски электрофоретических гелей. Причин неудовлетворительных результатов может быть несколько. Основными из них являются: низкая либо крайне высокая концентрация исходного образца ДНК (оптимальная концентрация должна быть в пределах 10-50 нг/мкл); неправильно составленная программа амплификации; ошибки последовательности нуклеотидов в олигонуклеотидных праймерах, применяемых в ПЦР; использование реагентов с истекшим сроком годности.

При электрофоретической детекции для получения более четкого фракционирования следует использовать только свежеприготовленные буферные растворы и избегать перегрева электрофоретической камеры.

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель организации

\_\_\_\_\_

(подпись)

\_\_\_\_\_

(инициалы, фамилия)

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**АКТ**  
**о практическом использовании результатов исследования**

В \_\_\_\_\_  
(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования\*)

Комиссия в составе \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ настоящим подтверждает,

что \_\_\_\_\_  
(название структурного подразделения организации)

*проведено опытно-промышленное испытание (осуществлено внедрение в технологический процесс, в учебный процесс и др.\*\*)*

\_\_\_\_\_ (указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)  
полученных \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (фамилия, имя, отчество автора (авторов) исследования)  
при выполнении программы (проекта, темы НИР\*\*) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (название программы, проекта, темы НИР\*\*)  
для \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (указываются решаемые практические задачи)  
на основании чего \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (приводятся конкретные результаты практического использования)

Экономический эффект от использования результатов составил \_\_\_\_\_  
(расчет прилагается)\*\*\*.

Члены комиссии: \_\_\_\_\_ (подпись) \_\_\_\_\_ (инициалы, фамилия)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (дата)