

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц



« 16 » марта 2016 г.

Регистрационный № 194-1115

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ МОТОРНО-СЕНСОРНОЙ НЕЙРОПАТИИ
I ТИПА, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ТОЧЕЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ**

В ГЕНЕ PMR22

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ:

к.б.н. Т.В. Осадчук, к.м.н. Н.В. Румянцева, к.м.н. И.В. Наумчик

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич
18.03.2016

Регистрационный № 194-1115

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ МОТОРНО-СЕНСОРНОЙ НЕЙРОПАТИИ I ТИПА,
ОБУСЛОВЛЕННОЙ ТОЧЕЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ RMR22**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук Т.В. Осадчук, канд. мед. наук Н.В. Румянцева, канд.
мед. наук И.В. Наумчик

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод молекулярно-генетической диагностики наследственной моторно-сенсорной нейропатии, обусловленной точечными мутациями в гене RMR22, который может быть использован для повышения эффективности медико-генетического консультирования (МГК) и пренатальной диагностики в семьях высокого риска.

Инструкция предназначена для врачей-генетиков медико-генетических центров (отделений, консультаций), врачей-неврологов, врачей лабораторной диагностики.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Биологический материал

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови.

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 ммоль $MgCl_2$, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), праймеры, бидистиллированная деионизированная вода (H_2O).

Последовательности праймеров для синтеза фрагментов гена RMR22:

ex1 1F CTCCTCGCAGGCAGAAACTC
1R CTGAACCAGCAGGAGCACGGG
ex2 2F TCAGGATATCTATCTGATTCTC
2R AAGCTCATGGAGCACAAAACC
ex3 3F TGGCCAGCTCTCCTAAC
3R CACCCCGCTTCCACATG
ex4 4F GCCATGGACTCTCCGTC
4R CCTATGTACGCTCAGAG

Проведение секвенирующей реакции

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: набор для сиквенса, 5X буфер для сиквенса, прямой и обратный праймеры, бидистиллированная вода.

Автоматический капиллярный электрофорез

Материалы и оборудование: генетический анализатор с программным обеспечением для сиквенса, вортекс, программируемый термостат, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: формамид, 4%-й раствор полимера для заполнения капилляра, 10X ЭДТА буфер, бидистиллированная вода.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Наследственная моторно-сенсорная нейропатия (НМСН, шифр по МКБ-10 G60.0) с поражением периферических нервов (двигательных и чувствительных), слабостью и атрофией мышц, нарушением походки и деформацией конечностей, а также различными сенсорными нарушениями (утрата болевой, тактильной и температурной чувствительности) после исключения трех наиболее частых подтипов НМСН: НМСН IA (дупликация гена RMP22), НМСН IB (точечные мутации в гене MPZ) и НМСН IX (точечные мутации в гене GJB1).

Алгоритм ДНК-диагностики наиболее частых форм наследственной моторно-сенсорной нейропатии I типа отображен на рисунке 1.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

Направление пациентов с симптомами проявления периферической нейропатии врачами-клиницистами на МГК

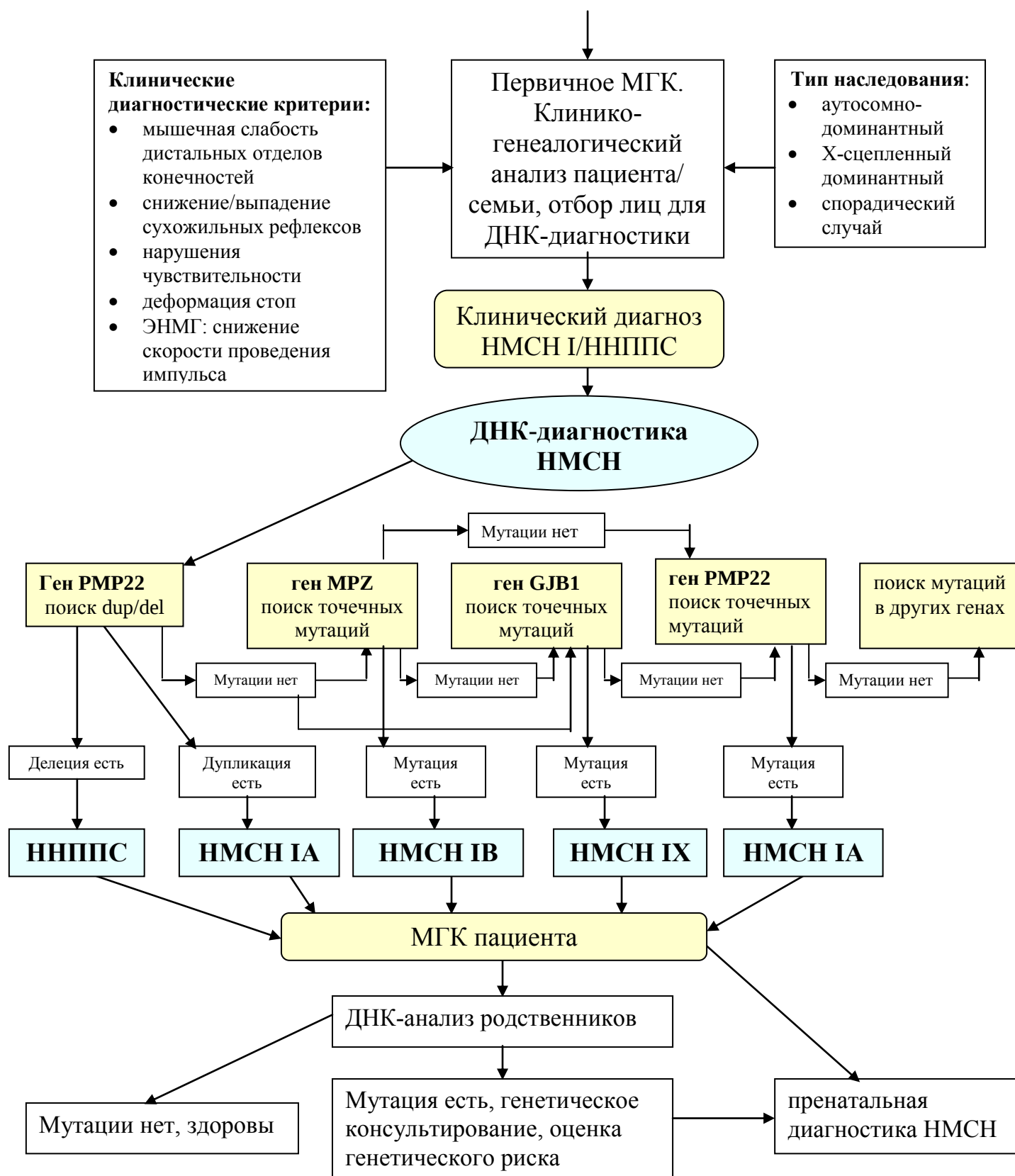


Рисунок 1. — Алгоритм ДНК-диагностики наиболее частых форм наследственной моторно-сенсорной нейропатии I типа

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Методика определения аллелей

Проведение ПЦР

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1хПЦР буфер, 2,5 ммоль $MgCl_2$, 200 мкмоль dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пмоль праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.

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

3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95°C. Затем выполняется 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 95°C, 1 мин отжига при 60°C и 1 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 секвенирующей реакции

1. В пробирки для ПЦР внести по 4 мкл секвенирующей смеси, 2 мкл секвенирующего буфера, 2 пмоль прямого или обратного праймера, 4 мкл ПЦР-продукта и бидистиллированной воды до 20 мкл.

2. Пробирки поместить в амплификатор и провести 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 10 с денатурации при 96°C, 5 с отжига при 50°C и 4 мин синтеза при 60°C.

3. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

Автоматический капиллярный электрофорез

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

Анализ производить при следующих параметрах:

- длина капилляра — 36 см;
- заполнение капилляра 4%-м полимером;
- температура — 50°C;
- время инъекции образца в капилляр — 5 с;
- время разделения — 36 мин;
- напряжение 11 кВ.

Подготовка проб:

1. В пробирку с высушенным продуктом секвенирующей реакции добавить 15 мкл формамида.

2. Встряхивать на вортексе до полного растворения.

3. Пробы денатурировать 2 мин при 95°C.

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

5. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.

6. Перенести весь объем пробы в микропробирки.

Анализ проб:

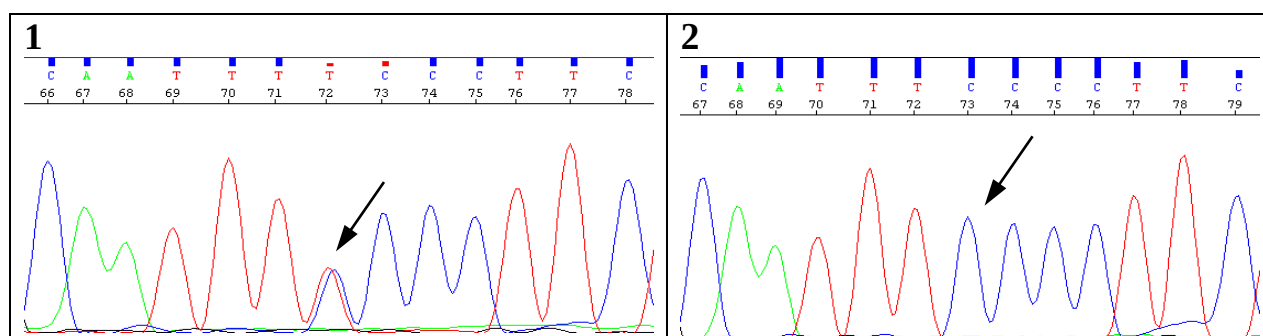
1. Установить штатив в анализатор.

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

При выполнении прямого секвенирования идентификацию мутаций проводят исходя из зафиксированных изменений в последовательности нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК (рисунок 2). При обнаружении мутации в гене RMR22 ставится диагноз: наследственная моторно-сенсорная нейропатия IA типа (шифр по МКБ-10 G60.0).



1 — однонуклеотидная замена в гетерозиготном состоянии; 2 – норма.
Стрелкой отмечено место нуклеотидной замены.

Рисунок 2. — Результаты секвенирования второго экзона гена RMR22

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, 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 лаборатории необходимо выделять несколько зон:

1. Зона экстрагирования ДНК — в ней осуществляют все этапы обработки биологического материала и выделения геномной ДНК.

2. 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 (первой и второй) не следует открывать пробирки с продуктами амплификации, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне.

3. Зона анализа продуктов ПЦР — в ней проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.