

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения
Главный государственный санитарный врач



М.И. Римжа

12 апреля 2005 г.

Регистрационный № 211–1203

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ
ГНЕЗДОВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ
ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии

Авторы: Е.П. Счесленок, А.С. Владыко, И.И. Григорович, Н.Ф. Маринич, А.С. Левкович

Инструкция предназначена для специалистов (НИИ, ЦГЭ, медицинских учреждений), занимающихся лабораторной диагностикой вирусных заболеваний, в частности вируса гепатита С (ВГС).

Ключевую роль в персистенции ВГС играет вирусный фактор, а именно генетическая неоднородность (существует более 6 генотипов ВГС) и высокая мутационная изменчивость вирусного генома. Поэтому течение болезни, исход, эффективность лечения и диагностика ВГС зависят в решающей степени от генотипа. Появление в последние годы возможности детекции РНК ВГС и определение его генотипов с помощью реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) выявило новые возможности в изучении проблемы ВГС. Геномные последовательности различных изолятов ВГС могут варьировать в пределах 33%. Значение геномной гетерогенности состоит в том, что вирусы с определенными генотипами вызывают более тяжелую патологию и более устойчивы к лечению современными терапевтическими средствами. При известном географическом распределении отдельных генотипов ВГС генотипирование изолятов может быть полезным инструментом для определения этиологического агента, являющегося источником вспышки. Кроме того, генотипирование может быть использовано для выяснения источника заражения гепатитом С при передаче от пациента к пациенту. Показана связь между генотипами ВГС и способом инфицирования. Генотипирование ВГС может осуществляться с использованием типоспецифических праймеров в ПЦР.

1. ГНЕЗДОВАЯ ПЦР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ВГС

1.1. Меры предосторожности и правила работы при постановке ПЦР

Все манипуляции проводят при соблюдении правил работы с вирусами II–III группы.

Все этапы ПЦР выполняют в стерильных условиях с использованием перчаток, свободных от талька.

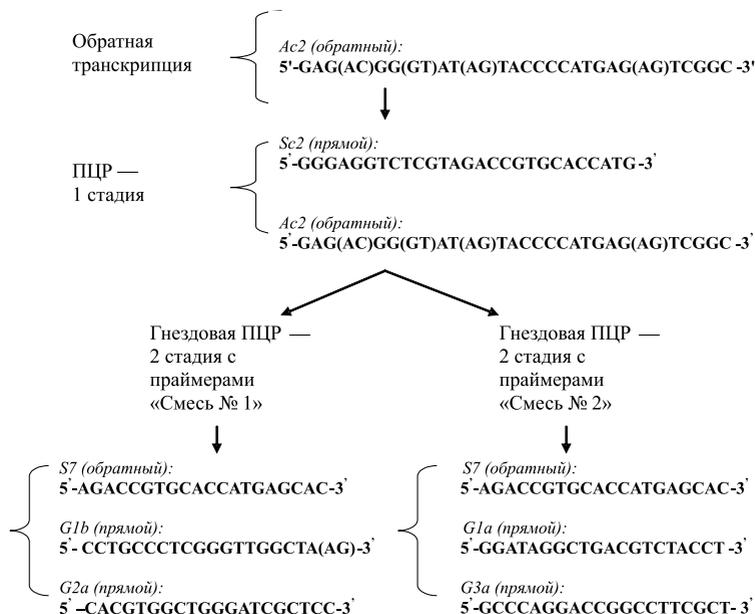
Постановку ПЦР осуществляют в трех рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) — подготовка ПЦР-реагентов. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) — подготовка проб

и контролей, выделение РНК, внесение проб в пробирки с ПЦР-реагентами. Зона 3 — проведение амплификации и детекция амплифицированной ДНК. Пробы из зоны 3 запрещается переносить в зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей. Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую.

1.2. Праймерные последовательности

Праймерные последовательности синтезируют под заказ различные фирмы-производители, в том числе «Литех», «Синтол» (Россия).

Для осуществления гнездовой ПЦР для генотипирования ВГС используют следующий набор праймеров:



1.2.1. Расчет рабочих концентраций праймеров

Поставка ПЦР-праймеров производителем осуществляется в количествах, измеряющихся в оптических единицах (ОЕ) в лиофилизированном или растворенном виде. Для расчета рабочих концентраций праймеров ОЕ переводят либо в мкмоль, либо в пмоли. Определяют концентрацию праймера, исходя из того, что 1 ОЕ оли-

гонуклеотида соответствует концентрации 33 мкг/мл. Для праймера, имеющего длину n пар нуклеотидов (п.н.), поставляемого в количестве A_{260} (ОЕ), пересчет осуществляется следующим образом:

а) общее количество праймера (в пмоль):

$$Q = 33 \times 10^6 \times A_{260} / 324,5 \times n \text{ (пмоль)},$$

где Q — количество праймера (в пмоль), содержащееся в V (мкл) объеме раствора олигонуклеотида;

A_{260} — число оптических единиц;

n — длина олигонуклеотида;

б) количество праймера (в пмоль) в отбираемой аликвоте:

$$X = Qp / V,$$

где X — количество праймера (в пмоль), содержащееся в объеме отбираемой аликвоты раствора олигонуклеотида;

p — объем отбираемой аликвоты раствора олигонуклеотида (в мкл);

V — общий объем раствора олигонуклеотида (в мкл).

Пример.

Имеется 5 ОЕ 25-членного олигонуклеотида, растворенного в 1 мл (1000 мкл) раствора. Вопрос: Сколько пмоль в 1 мкл?

Рассчитываем по формуле:

$$Q = 33 \times 10^6 \times 5 / 324,5 \times 25 \approx 20339 \text{ пмоль},$$

$$X = 20339 \times / 1000 = 20,339 \text{ пмоль}.$$

Ответ: в одном микролитре раствора праймера ≈ 20 пмоль.

1.3. Контроли ПЦР

Для оценки специфичности ПЦР используют положительный и отрицательные контроли. В качестве положительного контроля используют кДНК ВГС. В качестве отрицательного контроля используют стерильную дистиллированную воду. Все манипуляции проводят параллельно для проб и для контролей.

1.4. Материалы

1. Taq-полимераза.
2. 10x Taq-буфер.
3. Обратная транскриптаза (вируса птичьего миелобластоза или вируса лейкемии мышей Молони) (поставляется в наборе).
4. 5x или 10x буфер для обратной транскрипции (поставляется в наборах для обратной транскрипции).
5. Олигонуклеотиды (не менее 3 ОЕ/мл).

6. Смесь дезоксинуклеотрифосфатов (дНТФ).
7. Ингибитор РНКазы.
8. TRI-реагент (Sigma) или РНКзоль микро (Амплисенс).
9. Диэтилпирокарбонат (ДЭПК).
10. Свободная от рибонуклеаз вода.
11. 25 ммоль раствор $MgCl_2$.
12. Минеральное масло.
13. Этанол.
14. Изопропанол.
15. Хлороформ.

1.5. Подготовка реагентов

Свободную от рибонуклеаз воду готовят посредством обработки диэтил-пирокарбонатом (ДЭПК) бидистиллированной деионизованной воды в концентрации 0,1% при 37 °С в течение ночи с последующим автоклавированием при 0,5 атм. 15 мин.

1.6. Оборудование

1. Термоциклер (амплифицирующее устройство).
2. Ламинарный бокс или УФ-стерилизуемое помещение.
3. Центрифуга типа «Эппендорф» с охлаждением и скоростью не менее 10 000 g;
4. Встряхиватель (вортекс).
5. Набор автоматических пипеток с измеряемым объемом от 0,5 мкл до 1 мл.
6. Сменные одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.
7. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки Эппендорф объемом 1,5; 0,5; 0,2 мл).

1.7. Выделение РНК из плазмы периферической крови

Для проведения генотипирования используется клинический материал (плазма крови), заведомо положительный на наличие РНК ВГС.

Выделение РНК осуществляют с использованием коммерческих наборов «РибоСорб» (Амплисенс, Россия) или TRI-реагент (Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя.

1.8. Хранение выделенной РНК

Для хранения к раствору РНК добавляют 2 объема 96% переогнанного этанола и помещают на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, а для длительного хранения помещают на $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.9. Обратная транскрипция

Стандартные реакционные смеси для обратной транскрипции производятся различными фирмами (Sigma, Promega, Amersham). В состав реакционных смесей входят буферный раствор(ы) и фермент — обратная транскриптаза (ревертаза) различного происхождения. Ингибитор РНКазы и смесь дНТФ поставляются отдельно.

Постановка реакции:

1. В 0,5 мл пробирки вносят:
 - а) 10 мкл РНК пробы;
 - б) 20 пмоль обратного праймера Ac2*.
2. Смесь аккуратно перемешивают, осаждают центрифугированием и помещают в термоциклер или твердотельный термостат на 5 мин при 65 °С.
3. По истечении времени нагревания пробирки достают и помещают в лед.
4. В пробы добавляют:
 - а) 5х или 10х буфер для обратной транскрипции (конечная концентрация — 1х);
 - б) 2 мкл дНТФ (10 ммоль);
 - в) обратную транскриптазу (100–200 ед.);
 - г) ингибитор РНКаз (20 ед.).

Общий объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Объем реакционной смеси при необходимости доводят с помощью свободной от РНКаз воды.

5. Смесь перемешивают, осаждают центрифугированием и выдерживают при комнатной температуре 10–15 мин.

6. Пробирки помещают в термоциклер и выдерживают 60 мин при 42 °С (время и температура, необходимые для работы фермента, указываются в инструкции производителя).

После синтеза кДНК на РНК-матрице полученные пробы используют для постановки 1-й стадии ПЦР.

1.10. ПЦР — 1-я стадия

Постановка: реакцию осуществляют с парой праймеров, описанной выше, на матрице кДНК, синтезированной в реакции обратной транскрипции.

* Последовательность праймера указана выше.

1. В рабочей зоне 1 проводят подготовку ПЦР-смеси (расчет на пробу с конечным объемом 50 мкл):

– 5 мкл × N — 10х ПЦР-буфера (конечная концентрация 1х);

– 3 мкл × N — MgCl₂ (исходная концентрация 25 ммоль — конечная концентрация 1,5 ммоль);

– 1 мкл × N — дНТФ (исходная концентрация 10 ммоль — конечная концентрация 200 мкмоль);

– 1 мкл × N — праймера Ac2 (2,5 пмоль);

– 1 мкл × N — праймера Sc2 (2,5 пмоль);

– 0,5 мкл × N — Taq-полимеразы (2,5 ед.);

– 36,5 мкл × N — H₂O.

Общий объем — 48,0 мкл × N.

2. Раскапывают ПЦР-смесь по 48 мкл на N пробирок (учитывая положительный и отрицательные контроли).

3. 2 мкл проб после обратной транскрипции вносят в подготовленные для ПЦР пробирки.

4. Смесь перемешивают на вортексе и осаждают кратким центрифугированием.

5. Минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные образцы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без термостатируемой крышки.

6. Программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

Режимы амплификации:

Температурный режим для 1-й стадии ПЦР

Цикл	Процесс	Температура	Время (мин)	Количество циклов
1.	денатурация	94 °С	5	1
2.	денатурация	94 °С	1	20
	отжиг	45 °С	1	
	элонгация	72 °С	1	
3.	денатурация	94 °С	1	20
	отжиг	60 °С	1	
	элонгация	72 °С	1	
4.	хранение	10 °С	20	1

Примечание. Режим представлен при использовании амплификаторов с регулированием температуры по матрице (MiniCycler, PTC-100).

Когда температура в ячейке амплификатора достигнет 80–95 °С, ставят программу на паузу, помещают пробирки в ячейки амплификатора, закрывают крышку и снимают программу с паузы.

1.11. ПЦР — 2-я стадия

Постановка гнездовой ПЦР (вторая стадия ПЦР) на матрице фрагмента ДНК, амплифицированного в первой стадии ПЦР, с использованием набора праймеров:

«Смесь № 1» — S7, G1b, G2a и «Смесь № 2» — S7, G1a, G3a.

1. Проводят подготовку смеси в рабочей зоне 1:

ПЦР-смесь № 1 (на N пробирок)		ПЦР-смесь № 2 (на N пробирок)	
1.	5 мкл × N — 10x Taq буфера (конечная концентрация 1x)	1.	5 мкл × N — 10x Taq буфера (конечная концентрация 1x)
2.	3 мкл × N — MgCl ₂	2.	3 мкл × N — MgCl ₂
3.	1 мкл × N — дНТФ	3.	1 мкл × N — дНТФ
4.	по 1мкл × N — праймеров: S7, G1b, 2a (2,5 пмоль)	4.	по 1мкл × N — праймеров: S7, G1a, G3a (2,5 пмоль)
5.	35 мкл × N — H ₂ O (стерильной, деионизованной)	5.	35 мкл × N — H ₂ O (стерильной, деионизованной)
6.	1 мкл Taq-полимеразы (5,0 ед.)	6.	1 мкл Taq-полимеразы (5,0 ед.)
Конечный объем: 48 мкл на 1 пробу		48 мкл на 1 пробу	

2. Раскапывают ПЦР-смесь по 48 мкл на N пробирок.

3. 2 мкл проб после 1-й стадии ПЦР вносят в подготовленные пробирки.

4. Минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклов без термостатируемой крышки.

5. Программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже.

Режим амплификации:

Температурный режим для 2-й стадии ПЦР

Цикл	Процесс	Температура	Время (мин)	Количество циклов
1	2	3	4	5
1.	денатурация	94 °С	5	1
2.	денатурация	94 °С	1	30
	отжиг	62 °С	1	
	элонгация	72 °С	1	

Окончание таблицы

1	2	3	4	5
3.	хранение	10 °С	20	1

Примечание. Режим представлен при использовании амплификаторов с регулированием температуры по матрице (MiniCycler, PTC-100).

6. Когда температура в ячейке амплификатора достигнет 80–95 °С, ставят программу на паузу, помещают пробирки в ячейки амплификатора, закрывают крышку и снимают программу с паузы.

2. АНАЛИЗ ПЦР-АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК

Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК используют разные методы, наиболее простым из которых является гель-электрофорез в агарозе.

2.1. Материалы

1. ДНК-маркер 50–1000 пар оснований.
2. Агароза для электрофореза.
3. Трис.
4. Бромистый этидий.
5. ЭДТА.
6. Бромфеноловый синий.
7. Фикол.
8. Ледяная уксусная кислота.
9. Борная кислота.

2.2. Подготовка реагентов

1. Буферы для электрофореза:

ТАЕ (50х) на 1 л:	0,04 моль Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты) 0,002 моль ЭДТА (100 мл 0,5 моль ЭДТА рН 8,0)
ТБЕ (5х) на 1 л:	0,089 моль Трис-борат (54 г Трис, 27,5 г борной кислоты) 0,002 моль ЭДТА (20 мл 0,5 моль ЭДТА рН 8,0)

2. 1,5–2% агароза — 1,5–2 г агарозы на 100 мл 1х буфера ТАЕ или ТБЕ. Агарозу плавят на водяной бане при 100 °С до полного расплавления.

3. Бромистый этидий — матричный раствор 10 мг/мл. Бромистый этидий вносят из матричного раствора в аликвоту расплавленной остывшей до 55–56 °С агарозы до конечной концентрации 0,1–10 мкг/мл.

4. Буфер для нанесения проб: 0,25% бромфеноловый синий, 20% фикола 400, 0,1 моль ЭДТА.

2.3. Оборудование

1. Источник питания (источник постоянного тока).
2. Прибор для горизонтального электрофореза.
3. Трансиллюминатор.
4. Фото- или видеокамера с фильтрами для съемки в УФ.
5. Гребенки для горизонтального электрофореза.
6. Автоматические пипетки и наконечники.

2.4. Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза

Реагент бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все манипуляции проводят с использованием перчаток. Все реагенты, содержащие бромистый этидий перед утилизацией следует подвергать специальной обработке (см. ниже).

2.5. Постановка электрофореза

1. В электрофорезную кювету вставляют гребенку так, чтобы расстояние между дном кюветы и зубцами гребенки составляло 1 мм.

2. Подготовленную агарозу заливают в электрофорезную кювету с гребенкой и дают ей застыть.

3. После застывания агарозы гребенку аккуратно достают, стараясь не повредить образовавшиеся лунки, и помещают в прибор для электрофореза так, чтобы лунки располагались ближе к отрицательному электроду.

4. В случае использования минерального масла проводят подготовку ПЦР-продуктов, добавляя 100 мкл хлороформа с последующим встряхиванием и центрифугированием при 12 000 g в течение 1 мин. Верхнюю водную фазу переносят в новые пробирки. Пробы амплифицированные без минерального масла не требуют подготовки.

5. 15 мкл ПЦР-амплифицированной подготовленной пробы вносят в новые пробирки и добавляют 3 мкл буфера для проб, перемешивают.

6. Прибор для электрофореза наполняют 1x буфером ТАЕ или ТБЕ так, чтобы агароза была полностью им покрыта.

7. Через слой жидкости внимательно в отдельные лунки вносят по 15–20 мкл ДНК-маркера, положительный, отрицательный контроли и пробы.

8. Электрофорез проводят при напряжении 10–15 В/см.

2.6. Обезвреживание реагентов

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 моль раствора калия перманганата и 1 объем 2,5 моль соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4–6 ч. Добавляют 1 объем 2,5 моль натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

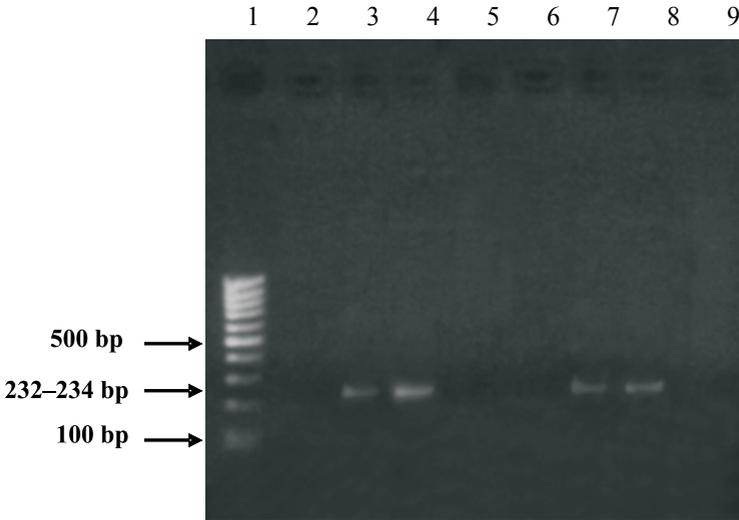
2.7 Учет результатов

Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора. При этом агарозный гель либо достают из кюветы и помещают на стекло трансиллюминатора либо используют емкости из УФ-проницаемых материалов.

При постановке гнездовой ПЦР для определения генотипа исследуемой РНК ВГС в результате анализа ДНК-фрагментов, синтезированных в присутствии праймеров «Смесь № 1», идентифицируются фрагмент размером 234 п.о., соответствующий генотипу 1в, и фрагмент размером 190 п.о., соответствующий генотипу 2а. Аналогично в присутствии праймеров «Смесь № 2» синтезируются фрагменты ДНК размером 209 и 232 п.о., соответствующие генотипам 1а и 3а.

Результаты анализа ПЦР-продуктов можно фиксировать посредством фотографирования или видеосъемки геля при использовании УФ-фильтров. В приложении представлен рисунок электрофореграммы результатов генотипирования изолятов ВГС.

Приложение



Электрофоретический анализ в 2% агарозном геле фрагментов ДНК, синтезированных в гнездовой ПЦР:

дорожка 1 — маркер молекулярных масс ДНК (100 bp ladder DNA);

дорожки 2, 4, 6 и 8 — продукты амплификации проб № 2, 6, 13 и 15 в гнездовой ПЦР с использованием праймеров «Смесь № 1»;

дорожки 3, 5, 7 и 9 — продукты амплификации проб № 2, 6, 13 и 15 в гнездовой ПЦР с использованием праймеров «Смесь № 2».

Специфический продукт ДНК для проб № 2 (дорожка 3) и № 13 (дорожка 7) обнаруживается при постановке реакции с праймерами «Смесь № 2» и имеет размер фрагмента, соответствующий генотипу 3а (232 п.о.). Фрагмент ДНК, соответствующий генотипу 1в (234 п.о.), синтезируется в гнездовой ПЦР с праймерами «Смесь № 1» в пробах № 6 (дорожка 4) и № 15 (дорожка 8).