

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

10.12.2010 г.

Регистрационный № 226-1210

**ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К  
РАЗВИТИЮ АМИЛОИДОЗА  
У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ:

Тушина А.К., канд. мед. наук Чиж К.А., д-р. мед. наук, проф. Сорока Н.Ф.,  
канд. биол. наук Даниленко Н.Г., канд. биол. наук Сивицкая Л.Н.

Минск 2010

Определение связи генотипа с риском развития амилоидоза у пациентов с ревматоидным артритом в Республике Беларусь ранее не проводилось. Поэтому данная инструкция разработана с целью информирования врачей-ревматологов Республики Беларусь о возможности определения генетической предрасположенности к развитию вторичного амилоидоза при ревматоидном артрите.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ**

### **Перечень необходимого лабораторного оборудования:**

программируемый термостат (амплификатор), миницентрифуга (вортекс) холодильник с морозильной камерой, прибор для горизонтального электрофореза ДНК-фрагментов в агарозном геле, прибор для вертикального электрофореза ДНК-фрагментов в полиакриламидном геле, СВЧ-печь или водяная баня, источник питания, аппарат для визуализации электрофоретических спектров в ультрафиолете (трансиллюминатор), цифровая камера для съемки, микропипетки на разные объемы с одноразовыми сменными наконечниками (до 10, 200, 1000 мкл), пробирки Eppendorf объемом 1,5 мл и ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда.

### **Биологический материал:**

Метод ДНК-диагностики мутаций гена *SAA1* основан на выделении микроколичеств ДНК из лейкоцитов периферической крови и последующем ПЦР-ПДРФ анализе. Для анализа достаточно 50 мкл периферической крови, взятой из пальца пациента.

### **Реактивы:**

- 10-кратный буфер для ПЦР (состав: 750 ммоль/л Трис-НСl рН 8.8, 200 ммоль/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1% Тритон X-100, 10 моль/л. Тартразин и 5% Фикол 400)
- раствор 25 мМ  $\text{MgCl}_2$
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)
- ДНК-полимераза *Taq*,
- две пары специфических праймеров (последовательность праймеров приведена в табл.1 ),
- рестриктазы *BclI* и *BanI* и соответствующий 10-кратный буфер для рестрикции ( $\text{Y}^+$ /Tango)
- 40% раствор акриламида и бис-акриламида в соотношении 19:1
- 20% раствор персульфата аммония (ПСА)
- ТЕМЕД как инициатор полимеризации,
- маркеры молекулярного веса  $\rho\text{UC19/MspI}$  или 100 п.н.+1,5 тыс.п.н. (НПО «Fermentas», Вильнюс)
- раствор краски бромфеноловый синий для нанесения образцов
- 10X раствор трис-боратного буфера
- идистиллированная деионизированная вода.

Последовательности праймеров к полиморфным участкам гена *SAAI*

Полиморфизм	Прямой праймер, 5`-3`	Обратный праймер, 5`-3`
-13 T/C	ACA TCT TGT TCC CTC AGG TTG	GCT GTA GCT GAG CTG CGG
2995 C/T, 3010 C/T	GCC AAT TAC ATC GGC CTC AG	TGG CCA AAG AAT CTC TGG AT

**Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов гена *SAAI***

**Материалы и оборудование:** программируемый термостат, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками, пробирки Eppendorf объемом 1,5 мл и пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл.

**Реактивы:** рестриктазы *AciI*, *BanI* и *BclI* и соответствующий 10-кратный буфер для рестрикции, бидистиллированная деионизированная вода.

**Электрофоретическое разделение рестриктных фрагментов**

**Материалы и оборудование:** камера для электрофореза, набор стекол, спейсеров и гребенок для электрофореза, источник питания, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками, химическая посуда.

**Реактивы:** 40% раствор акриламида и бис-акриламида в соотношении 1:19, 20% ПСА, ТЕМЕД как инициатор полимеризации, маркер молекулярного веса рUC19/*MspI* или 100 п.н.+1,5 тыс.п.н., раствор краски бромфеноловый синий для нанесения образцов, 10X раствор трис-боратного буфера.

**Визуализация рестриктных фрагментов в УФ-свете**

**Материалы и оборудование:** трансиллюминатор, цифровая камера для съемки, емкость для окрашивания, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

**Реактивы:** раствор бромистого этидия (0,0001%).

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *SAAI***  
**Полимеразная цепная реакция для идентификации 2995C/T и 3010C/T мутаций гена *SAAI***

1. Приготовить амплификационную смесь из расчета 15 мкл на один образец ДНК. Смесь должна содержать конечные концентрации: 10–20 нг геномной ДНК, 1x буфер для амплификации, 50 нмоль  $MgCl_2$ , 2 нмоль каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (дНТФ), 2,5 единицы ДНК-полимеразы *Taq*, по 10 пмоль каждого праймера. Амплификационная смесь готовится в пробирке Eppendorf (1,5 мл).
2. В пробирки для ПЦР внести по 14 мкл амплификационной смеси и 1 мкл образца ДНК. Пробирки поместить в амплификатор с заданной программой: денатурация 94 °C — 5 мин, [94 °C — 1 мин, отжиг 62 °C — 1 мин, синтез 72 °C — 1 мин ] x30 циклов, досинтез 72 °C — 7 мин. В ходе ПЦР синтезируется фрагмент длиной 518 п.н.
3. По окончании ПЦР пробирки поместить в холодильник (4 °C).

## Полимеразная цепная реакция для идентификации *-13 T/C* мутации гена *SAAI*

Полимеразная цепная реакция для идентификации *-13 T/C* мутации выполняется аналогичным образом, но с соответствующими праймерами и программой: денатурация 94 °С — 5 мин, [94 °С — 45 с, отжиг 6 °С — 60 с, синтез 72 °С — 60 с]x35 циклов, досинтез 72 °С — 7 мин. В ходе ПЦР синтезируется фрагмент длиной 229 п.н. По окончании ПЦР пробирки поместить в холодильник (4 °С).

## Рестрикционный анализ для идентификации *2995C/T* и *3010C/T* мутаций гена *SAAI*

1. Приготовить реакционную смесь из расчета 3 мкл на образец амплифицированного фрагмента ДНК (518 п.н.). В объеме 3 мкл смесь должна содержать: 1) для определения *2995C/T* аллелей — 0,3 единицы рестриктазы *BanI*, 1x буфера; 2) для определения *3010C/T* аллелей — 0,3 единицы рестриктазы *BclI*, 1x буфера;
2. Добавить по 3 мкл реакционной смеси в образцы ДНК после проведения ПЦР. Тщательно перемешать и отцентрифугировать на микроцентрифуге.
3. Поместить пробирки в термостат с оптимальной температурой для работы рестриктаз *BanI*, а также *BclI* — 37 °С. Выдержать пробы в течение 5–12 ч.

## Рестрикционный анализ для идентификации *-13 T/C* мутации

Рестрикционный анализ на наличие *-13 T/C* выполняется аналогично с использованием рестриктазы *AclI*. Пробы выдерживаются в термостате при 37 °С в течение 5–12 ч.

После окончания рестрикции пробы поместить в холодильник.

## Элекрофоретическое разделение рестриктных фрагментов

Разделение *BanI*-фрагментов для идентификации *2995C/T* полиморфных аллелей следует проводить в 6% полиакриламидном геле в 1x трис-боратном буфере при напряжении 1 В/см в течение 5 ч.

Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного локуса *2995C/T* гена *SAAI* показано на рис. 1.

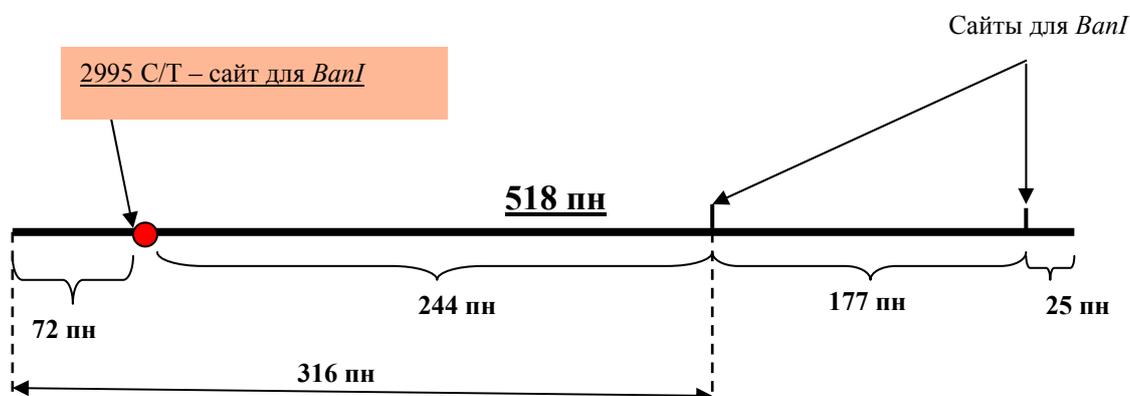


Рис. 1. Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного участка *2995C/T* гена *SAAI*

Основными фрагментами для генотипирования являются 72, 244 и 316 п.н. Все возможные комбинации длин рестриктных фрагментов после обработки рестриктазой *BanI* и их соответствие генотипам представлены в табл. 2.

Таблица 2

Полиморфизм гена *SAAl* по точечной замене 2995C/T

Длина фрагментов, п.н.	Генотип
244+177+72+25	CC
316+244+177+72+25	CT
316+177+25	TT

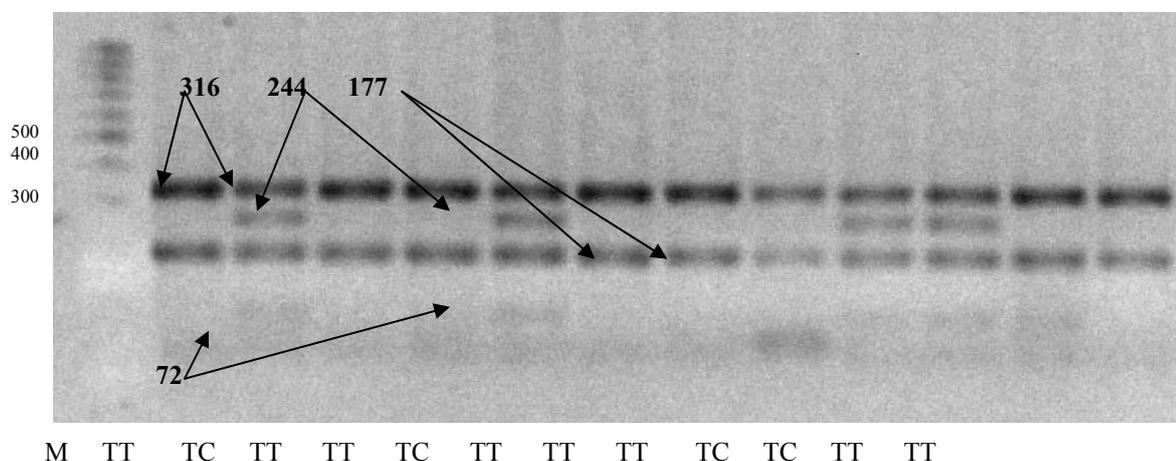


Рис. 2. Электрофореграмма *BanI* фрагментов 2995C/T локуса  
Указаны размеры фрагментов рестрикции,  
слева – маркер длин 1.5+100п.н., снизу – генотипы

Детекцию результатов электрофоретического разделения фрагментов для идентификации 3010 T/C полиморфных аллелей следует осуществлять в 2% агарозном геле. В случае однонуклеотидной замены в положении 3010 гена *SAAl* рестриктаза *BclI* разрезает амплифицированный фрагмент (518 п.н.) на 427 и 91 п.н. Возможные варианты длин рестриктных фрагментов после обработки рестриктазой и их соответствие генотипам представлены в табл. 3.

Таблица 3

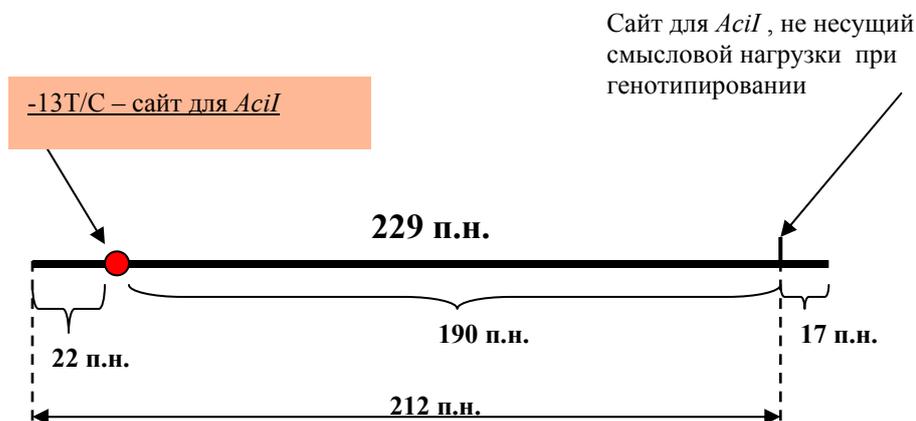
Полиморфизм гена *SAAl* по точечной замене 3010C/T

Длина фрагментов, п.н.	Генотип
518	CC
518+427+91	CT
427+91	TT

Детекцию результатов электрофоретического разделения фрагментов для идентификации **-13** С/Т полиморфных аллелей следует осуществлять в 8% полиакриламидном геле.

Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного локуса **-13Т/С** гена *SAAI* показано на рис. 3.

Возможные варианты длин рестриктных фрагментов после обработки рестриктазой *AciI* и их соответствие генотипам представлены в табл. 4.



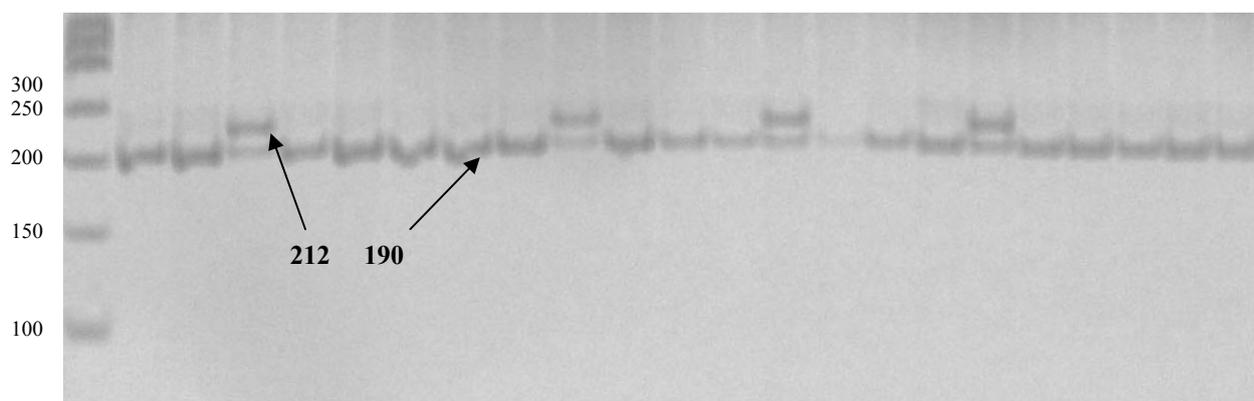
**Рис. 3.** Схематическое изображение ПДРФ-анализа полиморфного участка **-13Т/С** гена *SAAI*

Таблица 4

Полиморфизм гена *SAAI* по точечной замене **-13Т/С**

Длина фрагментов, п.н.	Генотип
212+17	<i>TT</i>
212+190+22+17	<i>TC</i>
190+22+17	<i>CC</i>

Фрагменты длиной 17 и 22 п.н. в геле не обнаруживаются из-за низкой молекулярной массы и суммарного заряда. Генотипы устанавливаются по тяжелым фрагментам — 212 и 190 п.н. (рис. 4).



М СС СС ТС СС СС СС СС СС ТС СС СС СС ТС СС СС СС ТС СС СС СС СС

**Рис. 4. Электрофореграмма *AciI* фрагментов -13T/C локуса**  
**Указаны размеры фрагментов рестрикции,**  
**слева – маркер длин 1,5+50 п.н., внизу – генотипы**

Таблица 5

Возможные генотипы по сочетанию аллельного полиморфизма  
 в позициях 2995 и 3010 гена *SAAI*

Генотипы по <i>SAAI</i>		
2995	3010	$\alpha, \beta, \gamma$
ТТ	СС	$\alpha/\alpha$
ТС	СТ	$\alpha/\beta$
ТС	СС	$\alpha/\gamma$
СС	ТТ	$\beta/\beta$
СС	ТС	$\beta/\gamma$
СС	СС	$\gamma/\gamma$
ТТ	ТС	

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

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Во избежание диагностических ошибок рекомендуется соблюдать следующие правила:

- использовать исключительно химически чистую и стерильную посуду;
- после работы с каждым объектом используемые поверхности лабораторных столов протирать этанолом;
- использовать одноразовые пробирки и наконечники для микропипеток;
- стерилизовать используемые растворы (если допустима их стерилизация) и хранить их разлитыми в стерильную посуду небольшими порциями, при возможности в замороженном состоянии;
- перед открыванием крышек пробирок осаждать растворы со стенок центрифугированием;

- в каждую серию проб включать отрицательный контроль — пробирку со всеми применяемыми растворами, но без ДНК;
- при выделении ДНК и постановке ПЦР лицо сотрудника должно быть защищено экраном или маской либо работа может выполняться в ламинаре; работать следует в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

В молекулярно-генетической лаборатории необходимо выделять несколько зон:

- зона выделения ДНК — в ней осуществляют все этапы обработки биологического материала и выделения геномной ДНК;
- зона проведения ПЦР — в ней выполняется внесение в ПЦР-пробирки очищенной ДНК и всех компонентов амплификационной смеси. В зонах экстрагирования ДНК и проведения ПЦР (первой и второй) не следует открывать пробирки с продуктами амплификации, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне;
- зона анализа продуктов ПЦР — в ней проводят рестрикцию, подготовку образцов для внесения в гель, электрофоретическое разделение ПЦР-ПДРФ продуктов и регистрацию результатов.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Наличие у пациентов ревматоидного артрита.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ**

Не установлены.

### **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И УРОВЕНЬ ВНЕДРЕНИЯ**

Инструкция предназначена для организации ДНК-типирования больных с ревматоидным артритом по гену белка сывороточного амилоида А (*SAAI*). Определение у пациентов генотипа  $\alpha/\alpha$  (полиморфные локусы 2995С/Т и 3010С/Т гена *SAAI*) является генетическим фактором риска развития амилоидоза как осложнения ревматоидного артрита в белорусской популяции. При разработке и внедрении способа оценки риска прогрессирования патологии почек при ревматических заболеваниях данные по аллельному состоянию *SAAI* гена являются объективной информацией, позволяющей рассчитать увеличение риска развития амилоидоза в зависимости от генетической предрасположенности. В настоящее время возможность выполнения данного анализа в Республике Беларусь существует на базе ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» в качестве платной медицинской услуги. Ориентировочная стоимость одного исследования (требуется однократное выполнение у любого пациента с РА в течение всей жизни) составляет приблизительно 30000 белорусских рублей.