

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный № 262-1215

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ  
НА НОСИТЕЛЬСТВО ДЕЛЕЦИИ 7 ЭКЗОНА ГЕНА SMN1

инструкция по применению

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

Авторы:

к.м.н. Вильчук К.У., к.б.н. Гусина Н.Б., к.м.н. Гусина А.А., Мясников С.О.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
23.12.2015  
Регистрационный № 262-1215

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ  
НА НОСИТЕЛЬСТВО ДЕЛЕЦИИ 7 ЭКЗОНА ГЕНА SMN1**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук К.У. Вильчук, канд. биол. наук Н.Б. Гусина, канд. мед.  
наук А.А. Гусина, С.О. Мясников

Минск 2015

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью создания эффективного метода молекулярно-генетического тестирования на носительство делеции 7 экзона гена SMN1, который может быть использован в комплексе медицинских мероприятий для диагностики и медицинской профилактики спинальной мышечной атрофии (шифр МКБ-10 G12.0-12.1).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-генетиков, врачей-педиатров, врачей-неврологов, врачей-акушеров-гинекологов.

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

Медицинские изделия для выделения ДНК; проведения мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA); количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР); анализа и документации полученных результатов.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Наличие в семье пациента с установленным диагнозом спинальной мышечной атрофии.
2. Выявление носительства делеции 7 экзона гена SMN1 у лиц, планирующих деторождение.
3. Пренатальная диагностика в семьях повышенного риска по спинальной мышечной атрофии.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Исследуемый материал**

Биологическим материалом для исследования является ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови человека, ворсин хориона, культивируемых клеток амниотической жидкости, других тканей человека.

### **Этапы молекулярно-генетического тестирования на носительство делеции 7 экзона гена SMN1**

Информационный этап — получение информированного согласия пациента в двух экземплярах согласно приложению.

Этап тестирования — выделение ДНК, определение числа копий 7 экзона гена SMN1 методом MLPA или КФ-ПЦР.

Алгоритм тестирования на носительство делеции 7 экзона гена SMN1 приводящей к развитию спинальной мышечной атрофии, представлен на рисунке.

### **Выделение ДНК**

Выделение ДНК, сорбированной на носителях для проведения молекулярно-генетических исследований, проводится согласно рекомендациям производителя.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови, ворсин хориона, культивируемых клеток амниотической жидкости, других тканей человека проводится согласно стандартным методам.

## **Определение числа копий 7 экзона гена SMN1 методом MLPA или КФ-ПЦР**

Молекулярная диагностика носительства делеции 7 экзона гена SMN1 проводится диагностическим набором MLPA P060-SMA.

### **Проведение реакции MLPA**

Денатурация ДНК:

1. в пробирки внести по 5 мкл раствора, содержащего 50–100 нг ДНК (10–20 нг/мкл);
2. пробирки поместить в амплификатор и провести первичную денатурацию образцов 5 мин при 98°C, затем охладить до 25°C.

### **Гибридизационная реакция**

Приготовить гибридизационную смесь: смешать 1,5 мкл MLPA-буфера и 1,5 мкл смеси MLPA-зондов для каждого анализируемого образца ДНК.

Добавить 3 мкл гибридизационной смеси в каждую пробирку, содержащую образец денатурированной ДНК. Перемешать пипетированием.

Продолжить программу амплификатора: инкубация 1 мин при 95°C, затем инкубация 16–20 ч при 60°C.

### **Лигазная реакция**

Приготовить лигазную смесь: 3 мкл лигазного буфера А, 3 мкл лигазного буфера В, 1 мкл Лигазы-65 и 25 мкл ddH<sub>2</sub>O для каждого образца.

Охладить образцы до 54 °С.

Добавить 32 мкл лигазной смеси в каждую пробирку и аккуратно перемешать пипетированием.

Продолжить программу: инкубация 15 мин при 54°C, затем 5 мин при 98°C.

### **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

Приготовить ПЦР-смесь: 2 мкл ПЦР-праймеров, 0,5 мкл SALSA полимеразы и 7,5 мкл ddH<sub>2</sub>O для каждого образца.

Охладить образцы до 20°C. Добавить 10 мкл ПЦР-смеси в каждую пробирку и аккуратно перемешать пипетированием.

Продолжить программу амплификатора: 35 циклов: 30 с при 95°C, 30 с при 60°C 1 мин при 72°C, далее конечная элонгация 20 мин при 72°C.

Обязательным условием при проведении реакции является использование не менее трех положительных контрольных образцов, в качестве которых можно взять ДНК клинически здорового донора.

Обобщенная программа термоциклера, необходимая для проведения реакции MLPA:

- денатурация ДНК: 1) 98°C — 5 мин; 2) 25°C — пауза;
- гибридизационная реакция: 3) 95°C — 1 мин; 4) 60°C — пауза;
- лигазная реакция: 5) 54°C — пауза; 6) 54°C — 15 мин; 7) 98°C — 5 мин;
- 8) 20°C — пауза;
- ПЦР-реакция: 9) 35 циклов: 95°C — 30 с; 60°C — 30 с; 72°C — 60 с; 10) 72°C — 20 мин; 11) 4°C — хранение.

## **Фрагментный анализ MLPA-продуктов на генетическом анализаторе ABI3500**

Приготовить образцы для нанесения на капилляр, смешав 1,0 мкл MLPA-продуктов, 0,5 мкл меченых стандартов молекулярных весов и 8,5 мкл формамида (HiDi).

Проинкубировать полученную смесь 5 мин при 95°C и охладить до 4°C.

Поместить смесь в анализатор. Электрофорез проводится при следующих параметрах: длина капилляра 55 см, вольтаж инъекции 1,6 кВ, время инъекции 15 с, полимер POP-7, вольтаж электрофореза 10 кВ, время электрофореза 55 мин.

### **Анализ данных**

Предварительная обработка данных выполняется с помощью стандартного пакета компьютерных программ для генетического анализатора. Проводится визуальная оценка качества пиков: их наличие, электрофоретическая подвижность, интенсивность сигнала, наличие неспецифичных сигналов.

Анализ данных проводится с помощью программного обеспечения, предназначенного для обработки результатов MLPA типа Coffalyser. Net или аналогичного.

### **Интерпретация результатов**

Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов  $<0,6$  — одна копия гена SMN1, гетерозиготный носитель делеции. Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов 0,9–1,1 — две копии гена SMN1, носительство делеции 7 экзона исключено.

### **Выполнение КФ-ПЦР**

Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1хПЦР буфер, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP, по 2 пмоль праймеров SMN-7F и SMN-7R и по 2 пмоль праймеров BRCA1E11-F и BRCA1E11-R и 0,5 единиц активности полимеразы.

Таблица — Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации

SMN-7F	6—FAM-CTATCAACTTAATTTCTGATCA
SMN-7R	CCCTTCCTTCTTTTGGATTTTGT
BRCA1E11-F	6—FAM-TGATTTGAACACCACTGAGA
BRCA1E11-R	CCGCCTATCATTACATGTTT

В пробирки для ПЦР внести по 20 мкл амплификационной смеси и анализируемую ДНК в количестве 50–100 нг.

Пробирки поместить в термоциклер и провести денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95°C. Затем выполнить 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 95°C, 30 с отжига при 55°C и 30 с синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72°C.

После окончания ПЦР образцы поместить в холодильник.

### **Проведение рестрикции**

Смесь для рестрикции объемом 18 мкл содержит: 6 мкл ПЦР продукта, 1х рестрикционный буфер и 5 единиц активности рестриктазы DraI. Инкубировать в течение 16 ч при 37°C.

### **Фрагментный анализ продуктов рестрикции на генетическом анализаторе ABI3500**

Продукт рестрикции в количестве 0,5 мкл смешать с 0,5 мкл маркера молекулярного веса LIZ 500 и 9 мкл формамида. Смесь инкубировать 3 мин при 95°C и охладить до 4°C. Электрофорез проводится при следующих параметрах: полимер POP-7, длина капилляра 55 см, вольтаж электрофореза 15 кВ, время электрофореза 25 мин.

### **Анализ данных**

Провести визуальную оценку качества паттерна пиков. Оценить наличие, величину сигнала и длину контрольных пиков.

Провести компьютерный анализ данных с помощью стандартного пакета компьютерных программ для генетического анализатора.

Провести расчет числа копий гена по формуле:

$$N = \left( \frac{\frac{SMN1п}{BRCAп}}{\frac{SMN1к}{BRCAк}} \right) \times 2 ,$$

где — SMN1п – интенсивность флуоресценции пика SMN1 анализируемого образца;  
SMN1к — интенсивность флуоресценции пика SMN1 контрольного образца с числом копий гена SMN1, равным 2;

BRCAп — интенсивность флуоресценции пика BRCA анализируемого образца;

BRCAк — интенсивность флуоресценции пика BRCA контрольного образца.

### **Интерпретация результатов**

Наличие 1-й копии гена SMN1 — гетерозиготный носитель делеции 7 экзона гена SMN1. Наличие 2-х копии гена SMN1 — носительство делеции 7 экзона гена SMN1 исключено.

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

I. Ошибки, связанные с нарушением правил забора, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований. Для предупреждения ошибок этой группы необходимо тщательно соблюдать правила работы с биологическим материалом и инструкцию по проведению лабораторных исследований.

II. Ошибки при выполнении собственно лабораторных исследований, связанные с несоблюдением протоколов исследований, использованием реагентов, утративших активность, загрязнением исследуемых образцов продуктами реакций и

др. Для предупреждения таких ошибок необходимо соблюдать протоколы исследований, контролировать годность реагентов, использовать контрольные материалы и образцы.

III. Ошибки, связанные с неправильной интерпретацией полученных результатов. Для предупреждения ошибок в интерпретации результатов лабораторных исследований необходимо обучение и повышение квалификации специалистов.

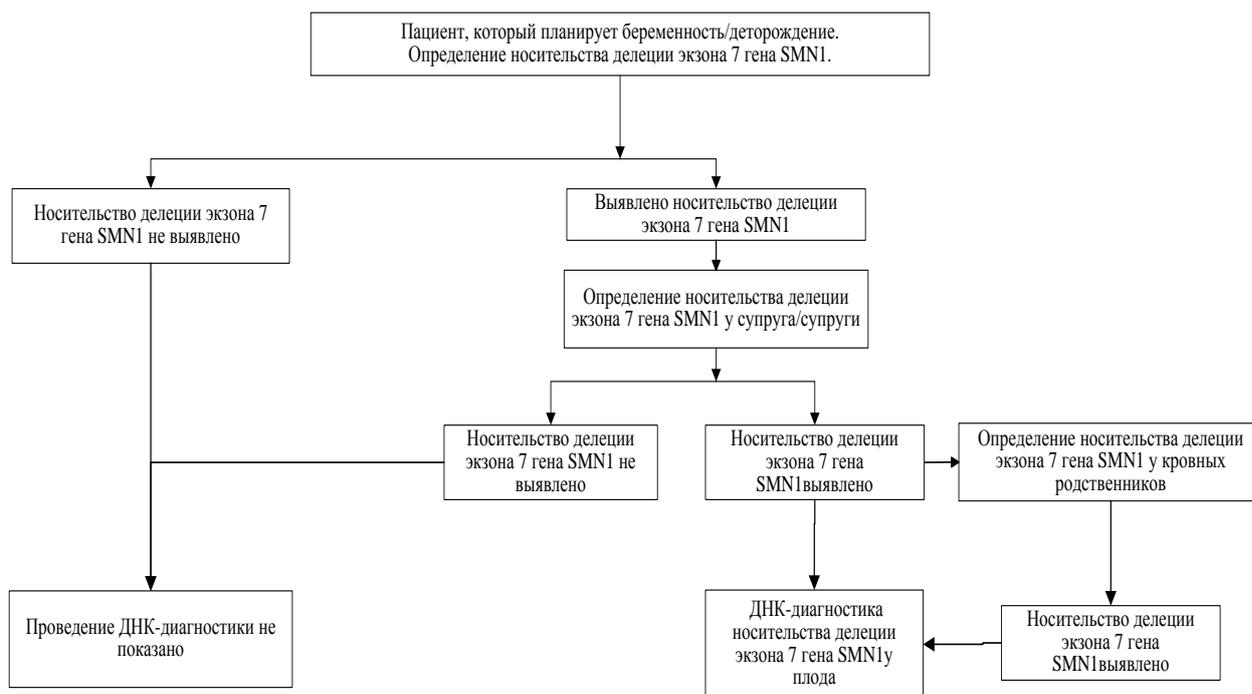


Рисунок — Алгоритм тестирования на носительство делеции 7 экзона гена SMN1

**Название учреждения****Информированное согласие на проведение ДНК-диагностики  
спинальной мышечной атрофии**

Фамилия, имя, отчество	Дата рождения

Адрес

Контактный телефон

Биологический материал

Я проинформирован(а), что:

1. Полученный материал будет использован для ДНК-диагностики спинальной мышечной атрофии.

2. Существует вероятность разрушения ДНК (естественный процесс), что может потребовать повторного взятия биологического материала для исследования.

3. Существует остаточный риск носительства заболевания.

4. По результатам ДНК-диагностики может быть необходима консультация врача-генетика.

5. Могу отказаться от ДНК-диагностики или ознакомления с результатами без объяснения причины. В случае моего отказа это никак не отразится на медицинской помощи, которую я буду получать в дальнейшем.

Я согласен(а) с тем, что:

результаты ДНК-диагностики могут быть использованы для научных исследований и могут войти в общую медико-генетическую документацию при условии, что это не приведет к раскрытию охраняемой законом тайны.

Дата

\_\_\_\_\_  
Подпись

## Спинальная мышечная атрофия

Спинальная мышечная атрофия (проксимальная спинальная мышечная атрофия, СМА) — наследственное заболевание, поражающее клетки спинного мозга, которые управляют мышцами. В результате развивается нарастающая слабость и паралич мышц, что приводит к невозможности двигаться, глотать, дышать.

Причиной СМА являются повреждения (мутации) гена SMN1. В большинстве случаев (95%) такое повреждение заключается в отсутствии (делеции) участка гена, который называется 7 экзоном гена SMN1.

Если оба родителя являются носителями делеции 7 экзона гена SMN1, то вероятность того, что ребенок унаследует от каждого родителя поврежденную копию гена и будет болен СМА, составляет 25% при каждой беременности. Выявление носительства делеции 7 экзона гена SMN1 и планирование семьи с учетом риска рождения больного ребенка — единственный эффективный способ профилактики СМА. В Беларуси частота носительства делеции 7 экзона гена SMN1 составляет 1:51, т. е. здоровым носителем является каждый 51-й житель.

Остаточный риск носительства — это вероятность оказаться носителем редких повреждений в гене SMN1, даже если при определении числа копий 7 экзона гена SMN1 признаков носительства заболевания не установлено. Современное состояние медицинской науки не позволяет исключить носительство повреждения в гене SMN1 со 100% вероятностью.

Носительство делеции 7 экзона гена SMN1 не угрожает здоровью носителя, не является поводом для его дискриминации. Результаты ДНК-диагностики строго конфиденциальны и могут быть переданы только обследуемому лицу лично.

Целесообразно запланировать обследование до наступления беременности. При планировании деторождения для определения риска рождения ребенка, больного СМА, можно провести ДНК-диагностику супругам. Если супруги не являются носителями мутации гена SMN1, вероятность СМА у ребенка невелика. Если супруги являются носителями делеции 7 экзона гена SMN1, необходима консультация врача-генетика для оценки риска рождения больного ребенка и планирования пренатальной диагностики.