

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

«12» _____ 2015 г.

Регистрационный № 263-1215

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ НА
НОСИТЕЛЬСТВО ДЕЛЕЦИЙ И ДУПЛИКАЦИЙ ЭКЗОНОВ ГЕНА DMD
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. Пиневич
23.12.2015

Регистрационный № 263-1215

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ
НА НОСИТЕЛЬСТВО ДЕЛЕЦИЙ И ДУПЛИКАЦИЙ
ЭКЗОНОВ ГЕНА DMD**

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 тестирования на носительство делеций и дупликаций экзонов гена DMD, который может быть использован в комплексе медицинских мероприятий для диагностики и медицинской профилактики мышечной дистрофии Дюшенна–Бекера (шифр МКБ-10 G71.0).

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

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Медицинские изделия, необходимые для выделения ДНК; мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA); анализа и документации полученных результатов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Клинические признаки наследственного нервно-мышечного заболевания.
2. Наличие в семье пациента с подтвержденным диагнозом мышечной дистрофии Дюшенна–Бекера.
3. Пренатальная диагностика в семьях с высоким риском рождения мальчика с мышечной дистрофией Дюшенна–Бекера.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Проведение тестирования не показано лицам при отсутствии признаков наследственного нервно-мышечного заболевания у пациента или членов его семьи.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Исследуемый материал

Биологическим материалом для исследования является ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, фибробластов, ворсин хориона, культивируемых амниоцитов, других тканей человека.

Этапы тестирования на носительство мышечной дистрофии Дюшенна–Бекера

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

Этап тестирования — выделение ДНК, определение делеций и дупликаций экзонов гена DMD.

Алгоритм тестирования на носительство делеций и дупликаций экзонов гена DMD, приводящих к развитию мышечной дистрофии Дюшенна–Бекера, представлен на рисунке.

Выделение ДНК

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови, фибробластов, ворсин хориона, культивируемых амниоцитов, других тканей человека проводится по стандартным методам.

Определение делеций и дупликаций экзонов гена DMD

Молекулярно-генетическое тестирование носительства делеций и дупликаций экзонов гена DMD проводится диагностическими наборами MLPA P034DMD и P035DMD.

Проведение реакции MLPA

Денатурация ДНК:

- в пробирки внести по 5 мкл раствора, содержащего 50–100 нг ДНК (10–20 нг/мкл);
- 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 ddH₂O для каждого образца;
- охладить образцы до 54°C;
- 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 ddH₂O 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.

Ниже приведена 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 минут при 95°C; 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.

Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов 0,4–0,6 — гетерозиготный носитель делеции экзонов гена DMD.

Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов 1,4–1,6 — гетерозиготный носитель дупликации экзонов гена DMD.

Количественное соотношение величин исследуемых и контрольных фрагментов 0,9–1,1 — носительство делеции или дупликации экзонов гена DMD 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 инструкции 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 срок годности реагентов, использовать контрольные материалы и образцы.

III. Ошибки, связанные с неправильной интерпретацией полученных результатов. Для предупреждения подобных ошибок необходимо обучение и повышение квалификации специалистов.

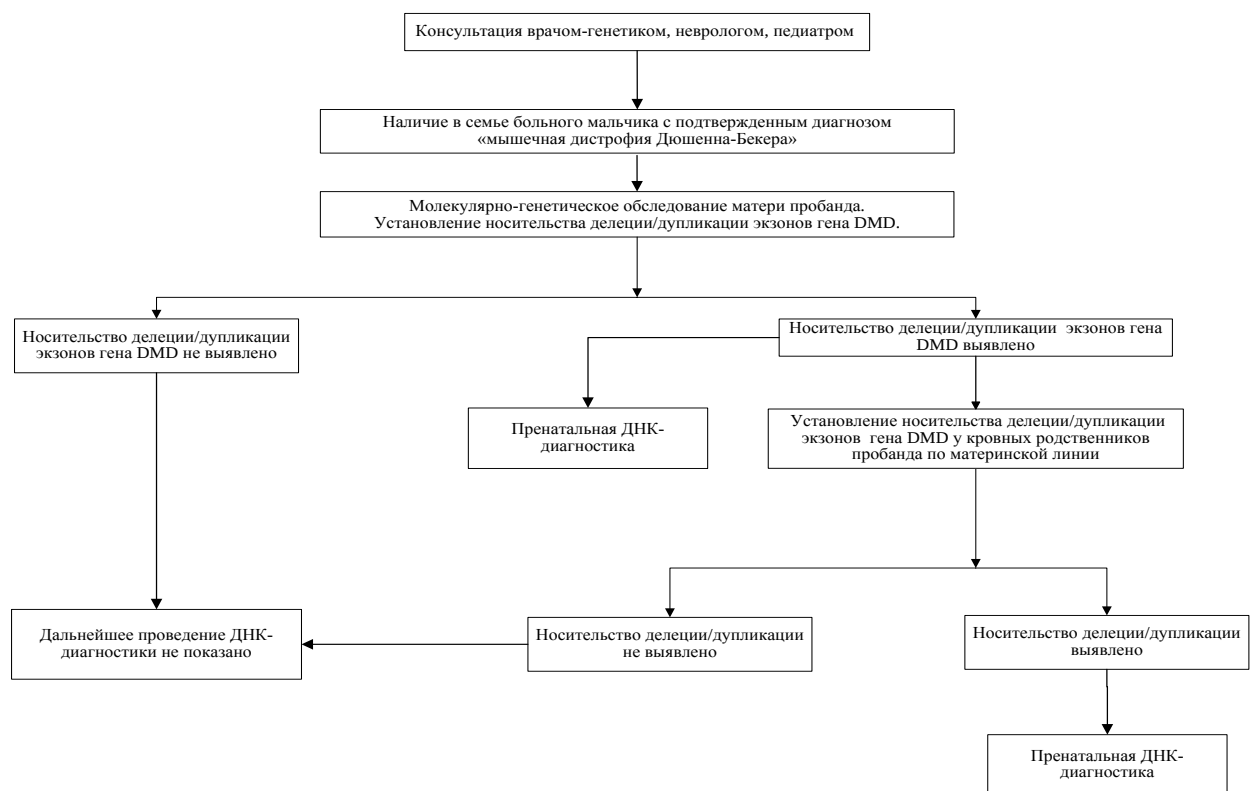


Рисунок — Алгоритм тестирования на носительство делеции или дупликации экзонов гена DMD

Название учреждения

**Информированное согласие на проведение ДНК-диагностики
мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера**

Фамилия, имя, отчество	Дата рождения

Адрес

Контактный телефон
Биологический материал

Я проинформирован(а), что:

1. Полученный материал будет использован для ДНК-диагностики мышечной дистрофии Дюшенна–Бекера.
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

Мышечная дистрофия Дюшенна-Бекера

Мышечная дистрофия Дюшенна-Бекера — наследственное заболевание, связанное с нарушением образования белка дистрофина. Нарушение образования дистрофина приводит к нарастающему разрушению мышц, что сопровождается развитием сердечной недостаточности и невозможностью самостоятельно передвигаться.

Причиной мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера являются повреждения (мутации) гена DMD. В большинстве случаев (65–75%) такое повреждение заключается в отсутствии (делеции) или удвоении (дупликации) крупного участка (экзона) гена DMD. У части пациентов (25–35%) выявляют другие повреждения этого гена — точечные мутации.

Женщины, как правило, не болеют мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера. Тем не менее, мутация может быть передана ребенку. Если поврежденный ген унаследует мальчик, то у него разовьется заболевание. Если женщина является носительницей мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера, то вероятность того, что ее сын унаследует мутацию гена DMD и будет болен мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера, составляет 50% при каждой беременности мальчиком. При беременности девочкой вероятность того, что дочь унаследует мутацию гена DMD, и будет носительницей мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера, также составляет 50% при каждой беременности девочкой.

Выявление носительства мутации гена DMD и планирование семьи с учетом риска рождения больного ребенка — единственный эффективный способ профилактики мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера.

Остаточный риск — это вероятность рождения мальчика с мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера, даже если при исследовании гена DMD признаков носительства заболевания не обнаружено. Остаточный риск обусловлен тем, что в 30% случаев развитие мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера обусловлено мутацией возникшей *de novo* (не унаследованной от матери).

Носительство мутации гена DMD, приводящей к развитию мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера не угрожает здоровью носителя, не является поводом для его дискриминации. Результаты ДНК-диагностики строго конфиденциальны и могут быть переданы только обследуемому лицу лично.

При планировании деторождения для определения риска рождения ребенка больного мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера необходима консультация врача-генетика.