

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
27.11.2014
Регистрационный № 124-1114

**МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА ОСТЕОПОРОЗА
У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. А.П. Шепелькевич, Ю.В. Дыдышко, канд. мед. наук С.С. Корытько, С.И. Марчук

Минск 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения полиморфизма гена рецептора витамина Д (VDR-FokI, VDR-BsmI, VDR-TaqI, VDR-ApaI) у пациентов с сахарным диабетом I типа с целью выделения групп высокого риска остеопороза.

Определение полиморфизма генов, ассоциированных с низкой костной массой (предикторов остеопоротических переломов), дает возможность прогнозировать риск развития остеопороза и обусловленных им переломов у пациентов с сахарным диабетом I типа.

Инструкция предназначена для врачей-эндокринологов, врачей-лаборантов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

1. ПЦР-бокс с УФ-лампой.
2. Твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C.
3. Программируемый термоциклер (амплификатор).
4. Весы технические.
5. Высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8–12000 об./мин.
6. Микроцентрифуга-вортекс 1,5–3000 об./мин (или вортекс).
7. Холодильник с морозильной камерой на -20°C.
8. Камера для горизонтального электрофореза.
9. Источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В.
10. УФ-трансиллюминатор.
11. СВЧ-печь для плавления агарозы.
12. Видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключенная к персональному компьютеру.
13. Планшет для заливки геля, гребенки, держатели гребенок.
14. Пипетки-дозаторы переменного объема (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл).
15. Штатив для хранения пробирок 1,5 мл.
16. Штативы для ПЦР-пробирок 0,2 мл.
17. ПЦР-пробирки 0,2 мл.
18. 0,5-миллиметровые пробирки для хранения аликвот жидких реагентов.
19. Одноразовые наконечники до 10, 200 и 1000 мкл.
20. Штативы для наконечников 10, 200 и 1000 мкл.
21. Емкость для сброса использованных наконечников.
22. Одноразовые перчатки.

Реактивы

1. Taq DNA полимеразы (рекомбинантная).
2. 10X Taq буфер.
3. 25 mM MgCl₂.
4. 2 mM dNTP.
5. Вода для молекулярно-биологических исследований, свободная от ДНК- и РНКаз.

6. 10X ТБЕ буфер.
7. Маркеры ДНК для электрофореза.
8. 0,5 М раствор ЭДТА.
9. Буфер нанесения.
10. Рестрикционные ферменты для определения каждого полиморфизма *VDR-FOKI* — FokI (BseGI), *VDR-BSMI* — BsmI (Mva1269I), *VDR-TaqI* — TaqI, *VDR-ApaI* — ApaI.
11. Агароза для электрофореза.
12. Раствор бромистого этидия.
13. Набор для выделения ДНК из цельной крови человека.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Сахарный диабет I типа.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Все три (выделение ДНК из биопроб, выполнение ПЦР и детекция продуктов амплификации) осуществляются в отдельных помещениях согласно основным принципам организации ПЦР-лабораторий и проведения молекулярно-биологической диагностики (инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.11.2008 № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)»).

I. Выделение ДНК из биопроб

Проводится забор венозной крови, в которую сразу добавляется 0,5 М раствор ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ ЭДТА. Венозную кровь, полученную с антикоагулянтом, немедленно после взятия перемешать переворачиванием пробирок с кровью, закрытых крышками, не менее 5 раз.

Перемешивание должно осуществляться без встряхивания и пенообразования. Время между началом наложения жгута и смешиванием крови с антикоагулянтом не должно превышать 2 мин. Собранная вышеописанным способом венозная кровь доставляется в лабораторию в течение не более 2 ч (при температуре 4–20°C).

Все дальнейшие манипуляции осуществляются согласно методике производителя наборов для очистки ДНК из образцов цельной крови.

Полученные пробы ДНК хранить при температуре 2–8°C не более 1 недели, или при температуре -20°C не более 6 мес. в аликвотах, избегая многократного размораживания.

II. Амплификация (проведение ПЦР)

Подготовка рабочей амплификационной смеси

При приготовлении рабочей амплификационной смеси каждый компонент добавляется отдельным наконечником с аэрозольными барьерами (фильтрами), в т. ч. и для внесения в пробирки препарата ДНК.

Рабочие смеси следует готовить непосредственно перед амплификацией. После внесения образца пробирки сразу помещаются в амплификатор.

За 20–30 мин до приготовления реакционной ПЦР-смеси извлечь все, кроме Taq ДНК-полимеразы, реагенты и исследуемые образцы ДНК из морозильника, разморозить их содержимое на льду и встряхнуть на вортексе в течение 5 с.

Приготовить и пронумеровать ПЦР-пробирки для амплификации вместимостью 0,2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб плюс отрицательный контроль (на льду).

Для каждой пробы готовятся 2 такие пробирки, одна из которых будет использоваться для электрофоретической регистрации продуктов амплификации, другая — для рестрикционного анализа, проводимого последовательно после ПЦР-реакции.

Для ПЦР используются праймеры, с помощью которых амплифицируются участки гена VDR, содержащие соответствующие полиморфизмы (табл. 1).

Таблица 1 — Структура праймеров для определения полиморфизмов гена VDR

Название полиморфизма	Нуклеотидная последовательность праймеров
VDR-FokI	F5'-CTGGCACTGACTCTGGCTCTGA-3' R5'-ACCTTGCTTCTTCTCCCTCCCT-3'
VDR-BsmI	F5'-ACCAAGACTACAAGTACCGCGTCA-3' R5'-CTCCCTCTTCTCACCTCTAACCAGC-3'
VDR-TaqI	F5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' R5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTC-3'
VDR-ApaI	F5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' R5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTC-3'

В отдельной пробирке вместимостью 0,5 мл (на льду) приготовить рабочую смесь для амплификации из расчета на N+1 пробы (табл. 2).

Таблица 2 — Компоненты рабочей смеси для амплификации из расчета на N+1 пробы

Реагенты	x1, мкл	x(N+1), мкл
Вода	14,8	14,8 x(N+1)
Прямой праймер, 15 пмоль/мкл	0,4	0,4 x(N+1)
Обратный праймер, 15 пмоль/мкл	0,4	0,4 x(N+1)
10XПЦР-буфер	3	3x(N+1)
dNPT, 2 мМ	3	3x(N+1)
MgCl ₂ , 25 мМ	2,4	2,4 x(N+1)
Taq ДНК-полимераза, 1U/пробу	1	(N+1)

Примечание — N — общее количество пробирок с исследуемыми образцами.

После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

Реакция амплификации

Добавить по 25 мкл рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки, подготовленные для амплификации и находящиеся на льду.

Внести отдельными наконечниками по 5 мкл образца из анализируемых проб

во все пробирки согласно нумерации. В качестве отрицательного контрольного образца вносится дистиллированная вода в объеме 5 мкл.

Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3–5 с при 1500–3000 об./мин при комнатной температуре (18–25°C) на микроцентрифуге-вортексе для осаждения капель со стенок пробирок. Перенести все ПЦР-пробирки в программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по программе, выбранной для каждого амплифицируемого участка.

Таблица 3 — Температурно-временная программа для определения *VDR-FokI*-полиморфизма

Т,С°	Время	Количество циклов
94	4 мин	1
94	30 с	33 цикла
60	20 с	
72	20 с	
72	5 мин	1

Таблица 4 — Температурно-временная программа для определения *VDR-BSMI*-полиморфизма

Т,С°	Время	Количество циклов
94	4 мин	1
94	30 с	33 цикла
65	20 с	
72	30 с	
72	5 мин	1

Таблица 5 — Температурно-временная программа для определения *VDR-TaqI*-полиморфизма

Т,С°	Время	Количество циклов
94	4 мин	1
94	30 с	33 цикла
65	20 с	
72	30 с	
72	5 мин	1

Таблица 6 — Температурно-временная программа для определения *VDR-ApaI*-полиморфизма

Т,С°	Время	Количество циклов
94	4 мин	1
94	30 с	33 цикла
65	20 с	
72	30 с	
72	5 мин	1

После окончания полимеразной цепной реакции все ПЦР-пробирки извлечь из амплификатора. Штатив с пробирками поместить в холодильник до проведения рестрикционного анализа и электрофореза.

Реакция рестрикции амплифицированных фрагментов эндонуклеазами II

Для рестрикционного анализа необходимо приготовить реакционную смесь непосредственно перед реакцией в расчете на необходимое количество исследуемых проб. Для этого за 20–30 мин до приготовления реакционной смеси извлечь необходимые реагенты, кроме фермента, из морозильной камеры, разморозить их на льду и тщательно встряхнуть на вортексе. Подготовить и пронумеровать пробирки вместимостью 0,2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб (из расчета на N+1 пробы). В отдельной пробирке вместимостью 0,5 мл (на льду) приготовить раствор для рестрикции ПЦР-амплифицированной ДНК. Фермент добавляется в раствор в последнюю очередь.

Таблица 7 — Компоненты раствора для рестрикции ПЦР-амплифицированной ДНК

Компонент	x1, мкл	x(N+1), мкл
Вода	10	(N+1)x17
10xFastDigest буфер	2	(N+1)x2
FastDigest фермент	1	(N+1)

Примечание — N — количество исследуемых образцов.

После перемешивания раствора пипетированием (20 раз) добавить по 13 мкл рабочей рестрикционной смеси во все пронумерованные пробирки. Внести по 10 мкл ДНК-продукта из пробирок после реакции амплификации в пробирки для реакции рестрикции согласно нумерации. Тщательно перемешать.

Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3–5 с при 1500–3000 об./мин при комнатной температуре (18–25°C) на микроцентрифуге-вортексе для осаждения капель со стенок пробирок.

Перенести пробирки в программируемый термостат (амплификатор) и провести рестрикцию для каждого исследуемого участка по программе с температурными и временными параметрами, указанными в инструкциях к ферментам. По окончании реакции пробирки поместить в холодильник (4–14°C) до проведения электрофореза.

Разделение продуктов реакции амплификации и рестрикции методом горизонтального гель-электрофореза

1. Залить в аппарат для электрофореза ТБЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 10xТБЕ в 10 раз (рН = 8,3): 70 мл 10xТБЕ добавить к 630 мл дистиллированной воды.

2. Для приготовления 2% геля к 3,0 г агарозы добавить 15 мл 10x ТБЕ буфера и 132 мл дистиллированной воды.

3. Приготовленную агарозную смесь расплавить в СВЧ-печи до однородности. Добавить к 150 мл расплавленной агарозы 15 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать до однородной окраски, избегая аэрации раствора.

4. Охладить расплавленную агарозу до температуры 50–60°C и залить в кювету для заливки геля. Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образцов нужно предварительно перед заливкой агарозы установить в кювету гребенку (ее зубцы не должны доставать до дна приметно 1 мм), при этом толщина гребенки и

толщина геля должны обеспечить объем карманов не менее 20–25 мкл. После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести кювету с гелем в камеру для проведения электрофореза.

5. Подготовить к электрофорезу образцы ПЦР-амплифицированной ДНК, для чего смешать их с буфером для нанесения (5:1, О/О).

Продукты рестрикции не нуждаются в дополнительной подготовке для нанесения на гель (рестрикционный буфер содержит глицерин и краситель).

6. Нанести в карманы геля по 15–20 мкл амплифицированной ДНК и продукта рестрикционного анализа в последовательности, соответствующей нумерации проб или схеме нанесения образцов. Для контроля длин полученных фрагментов использовать коммерческие маркеры длин ДНК при каждом электрофорезе наряду с образцами.

7. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение электрического поля 5–7 В/см геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов в направлении от катода (–) к аноду (+).

III. Детекция продуктов амплификации

Визуализация результатов электрофореза

Контроль электрофоретического разделения осуществляется визуально по движению полос красителей. Оптимальное время разгонки — 90 мин при напряжении электрического поля 6 В/см геля.

Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора. С гелем агарозы следует работать в перчатках, так как бромистый этидий является сильным мутагеном.

Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа (визуальную детекцию проводить только с защитным экраном либо в очках, не пропускающих УФ-излучение). Фрагменты амплифицированной ДНК и рестрикционные фрагменты проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при УФ-облучении. Полиморфизм оценивают согласно картине, полученной на электрофореграммах. Длины фрагментов устанавливают относительно набора определенных фрагментов ДНК известной длины.

Определение аллельных вариантов генотипа

Заключение о генотипе осуществляется исходя из полученной картины расположения фрагментов на электрофореграмме согласно табл. 8.

Таблица 8 — Варианты длин фрагментов ДНК-полиморфизма VDR и соответствующий им генотип

Исследуемый ген	Используемая рестриктаза	Полученные фрагменты, п.н.	Генотип
<i>VDR-FokI</i>	FokI (BseGI)	55, 196	W-W
		55, 196, 251	W-M
		251	M-M
<i>VDR-BsmI</i>	BsmI (MvaI269I)	196, 642	W-W
		196, 642, 838	W-M
		838	M-M
<i>VDR-TaqI</i>	TaqI	250, 494	W-W

		204, 250, 290, 494	W-M
		204, 250, 290	M-M
VDR-ApaI	ApaI	218, 527	W-W
		218, 527, 745	W-M
		745	M-M

Для обобщения интерпретации полученных данных использованы следующие обозначения:

Буква W обозначает наличие аллели дикого (обычного) типа у данного индивида, буква M — аллели мутантного (нового) типа. Таким образом, обозначение W-W или M-M указывает на гомозиготный генотип по определенному полиморфизму, а W-M — на гетерозиготный (одна аллель дикого типа, другая — мутантная).

Оценка результатов исследования полиморфизма гена рецептора витамина Д (VDR-FokI, VDR-BsmI, VDR-TaqI, VDR-ApaI) у пациентов с сахарным диабетом I типа

Предрасполагающими факторами высокого риска остеопороза у пациентов с сахарным диабетом I типа являются:

VDR-FokI — наличие мутантного генотипа MM (ff) — гомозиготного состояния или мутантной аллели M (f) в гетерозиготном состоянии (W-M — Ff).

VDR-ApaI — наличие мутантного генотипа MM (aa) — гомозиготного состояния или мутантной аллели M (a) в гетерозиготном состоянии (W-M — Aa).

VDR-BsmI — наличие дикой аллели W (B), преимущественно в гетерозиготном генотипе (W-M — BB).

VDR-TaqI — наличие дикой аллели W (T) — как в гомозиготном (W-W — TT), так и гетерозиготном генотипе (W-M — Tt).

Выявление вышеуказанного полиморфизма гена рецептора витамина Д свидетельствует о наличии высокого риска развития низкой костной массы у пациентов с сахарным диабетом I типа, что обуславливает необходимость регулярного мониторинга состояния минеральной плотности кости и проведения профилактических мероприятий, направленных на устранение факторов риска переломов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Контаминация чужеродной ДНК исследуемых образцов влечет за собой появление ложноположительных результатов. Это можно исключить, соблюдая требования, предъявляемые при проведении ПЦР, выделении ДНК из биопроб и детекции продуктов амплификации.

2. Отсутствие визуализации на электрофореграмме продуктов ПЦР по следующим причинам: либо ДНК не выделена из образца крови, либо не внесен образец выделенной ДНК в реакцию амплификации. Необходимо проверить точность выполнения манипуляций, которые должны соответствовать инструкции.

3. Недостаточное внесение фермента в среду для рестрикции ПЦР-продукта вызывает неоднозначность трактовки результатов. Следует строго следить за сроками

годности используемых реактивов, особенно ферментов.

4. Не визуализируются продукты реакций и ДНК-маркер на электрофореграмме (нет светящихся оранжево-красных полос при УФ-облучении). Не внесен этидиум бромида в агарозный гель при подготовке.