

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

13.04.2012г.

Регистрационный № 014-0212

Метод определения полиморфизма генов *COL1A1* (альфа 1 коллагена I типа) и *ESR1* (эстрогенового рецептора альфа) у пациентов с сахарным диабетом 1 типа

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

ГУ «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения»

АВТОРЫ:

Канд. мед. наук, доц., Шепелькевич А.П., Марчук С.И.,

Д-р. мед. наук, проф. Холодова Е.А., канд. мед. наук. С.С. Корытько,

Плетнева Е.Г., Кабак Н.С.

Минск 2012

Генный полиморфизм влечет за собой изменение интенсивности синтеза белка, кодируемого данным геном, или нарушение белковой структуры, что в свою очередь ведет к функциональным сдвигам, проявляющимся теми или иными патологическими процессами. 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 1 типа.

Целями настоящей инструкции являются: выделение групп высокого риска развития остеопоротических переломов среди пациентов с сахарным диабетом 1 типа для раннего выявления и профилактики; диспансерное наблюдение пациентов данного контингента для профилактики остеопоротических переломов.

Метод не имеет противопоказаний к использованию.

ОБОРУДОВАНИЕ И РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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 8–12 тыс. об/мин.
6. Микроцентрифуга-вортекс 1,5–3000 об/мин (или вортекс).
7. Холодильник с морозильной камерой на -20 °С.
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 мл пробирки для хранения аликвот жидких реагентов.
19. Одноразовые наконечники до 10, 200 и до 1000 мкл.
20. Штативы для наконечников 10, 200 и 1000 мкл.
21. Емкость для сброса использованных наконечников.
22. Одноразовые перчатки.

ОСНОВНЫЕ РЕАКТИВЫ

1. Taq DNA полимеразы (рекомбинантная).
2. 10X Taq буфер.

3. 25mM MgCl₂.
4. 2mM dNTP.
5. 10X ТБЕ буфер.
6. Вода для молекулярно-биологических исследований, свободная от ДНКаз и РНКаз.
7. Маркеры ДНК для электрофореза.
8. 0,5М раствор ЭДТА.
9. Буфер нанесения.
10. Рестрикционные ферменты для определения каждого полиморфизма *COLIA1* — PflMI (Van91I), *ESR1* — XbaI и PvuII.
11. Агароза для электрофореза.
12. Раствор бромистого этидия.
13. Набор для выделения ДНК из цельной крови человека.

ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПЦР, ВЫДЕЛЕНИИ ДНК ИЗ БИОПРОБ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

При выделении ДНК из цельной крови необходимо соблюдать меры безопасности так же, как при работе с потенциально инфицированным материалом.

В ходе реакции амплификации избегать контаминации проб чужеродной ДНК и защищать исследуемую ДНК от контаминации окружающего рабочего пространства. Вся работа должна проводиться в специальных помещениях с ламинарными боксами. Рабочее пространство должно быть обработано УФ-облучателями с интенсивностью не менее 10 лК/м³/мин в течение не менее 20 мин. Все используемые растворы должны храниться в замороженном виде в аликвотах.

С гелем агарозы следует работать в перчатках, так как бромистый этидий, содержащийся в геле, является сильным мутагеном.

Визуальную детекцию геля на трансиллюминаторе следует проводить только с защитным экраном либо в очках, не пропускающих УФ-излучение.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

Для исследований берется венозная кровь, в которую немедленно после забора добавляется 0,5М раствор ЭДТА до конечной концентрации 5мМ 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-х ч (при температуре 4–20 °С). Все дальнейшие манипуляции осуществляются согласно методике производителя наборов для очистки ДНК из образцов цельной крови.

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР (АМПЛИФИКАЦИЯ):

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

Рабочие смеси следует готовить непосредственно перед амплификацией. После внесения образца пробирки сразу помещают 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 проведения 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.

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

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

где 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 (1500–3000 об/мин) при комнатной температуре (+18...+25 °С) на микроцентрифуге-вортексе для осаждения капель со стенок пробирок.

Перенести все ПЦР-пробирки в программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по выбранной для каждого амплифицируемого участка своей программе.

Для определения *ESR1*-полиморфизма:

Т,С°	Время	Количество циклов
94	4 мин	1
94	30 с	35 цикла
62	15 с	
72	60 с	
72	5 мин	1
10	30 мин	1

Для определения *COL1A1*-полиморфизма:

Т,С°	Время	Количество циклов
94	4 мин	1
94	30 с	35 цикла
62	15 с	
72	20 с	
72	5 мин	1
10	30 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 проведения 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, следующий по составу (фермент добавляется в раствор в последнюю очередь):

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

где 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 (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 реакцию рестрикции 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 реакций амплификации и рестрикции методом горизонтального геля-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 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 °С 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 заметно 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 (+).

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 облучении УФ. Оценка полиморфизма производится согласно картине, полученной на электрофореграммах. Длины фрагментов оцениваются относительно набора определенных фрагментов ДНК известной длины. Например, в маркере ДНК «GeneRuler DNA Ladders 50bp» (Fermentas, Литва) сверху вниз полосы обозначают следующие фрагменты: 1000 п.н., 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50.

Определение аллельных вариантов генотипа. Заключение о генотипе осуществляется исходя из полученной картины расположения фрагментов на электрофореграмме согласно таблице:

Исследуемый ген	Используемая рестриктаза	Полученные фрагменты, п.н.	Генотип
<i>COL1A1</i>	PflMI (Van91I)	78, 182	W-W
		78, 182, 260	W-M
		260	M-M
<i>ESR1</i>	PvuII	269, 739	W-W
		269, 739, 1008	W-M
		1008	M-M
	XbaI	224, 784	W-W
		224, 784, 1008	W-M
		1008	M-M

Оценка результатов исследования полиморфизма генов *COL1A1* ($\alpha 1$ коллагена I типа) и *ESR1* (эстрогенового рецептора альфа) у пациентов с сахарным диабетом 1 типа. Предрасполагающими факторами снижения минеральной плотности кости у пациентов с сахарным диабетом 1 типа являются:

- *ESR1*-PvuII (+397T/C) — наличие мутантного генотипа CC (гомозиготного состояния) или мутантной аллели C в гетерозиготном состоянии.
- *ESR1*-XbaI (+351A/G) — наличие мутантного генотипа GG (гомозиготного состояния) или мутантной аллели G в гетерозиготном состоянии.
- *COL1A1*-Van91I (+1245G/T) — наличие мутантного генотипа TT (гомозиготного состояния) или мутантной аллели T в гетерозиготном состоянии.

Выявление вышеуказанного полиморфизма генов *COL1A1* и *ESR1* свидетельствует о наличии высокого риска развития низкой костной массы у пациентов с сахарным диабетом 1 типа, что обуславливает необходимость регулярного мониторинга состояния минеральной плотности кости и проведения профилактических мероприятий, направленных на устранение факторов риска переломов.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

- Контаминация чужеродной ДНК исследуемых образцов, что влечет за собой появление ложноположительных результатов. Это можно исключить, соблюдая требования, предъявляемые при проведении ПЦР, выделении ДНК из биопроб и детекции продуктов амплификации.
- Отсутствие продуктов реакции амплификации — не визуализируются на электрофорезе продукты 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.
- Недостаточное внесение фермента в среду для рестрикции ПЦР-продукта, что вызывает неоднозначность трактовки результатов. Следует строго следить за сроками годности используемых реактивов, особенно ферментов.
- Не визуализируются продукты реакций и ДНК-маркер на электрофорезе (нет светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ. Не внесен этидиум бромида в агарозный гель при подготовке).