



УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
— Е.Л.Богдан
«18» ноября 2021 г.
Регистрационный № 166-1220

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕРМИНАЛЬНОЙ МУТАЦИИ

2282del4 ГЕНА FLG

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и
экологии человека»

АВТОРЫ: к.б.н., доцент Силин А.Е., к.м.н. Зыблева С.В., к.б.н., доцент
Мартинков В.Н., Силина А.А., к.б.н., доцент Воропаева А.В.

Гомель, 2020

Перечень использованных сокращений:

FLG – ген, кодирующий филаггрин;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

НТФ – нуклеотидтрифосфаты;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

п.н. – пары нуклеотидов;

ТБЕ буфер – трис-ЭДТА-боратный буфер.

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярно-генетического анализа герминальной мутации 2282del4 гена FLG посредством аллельспецифической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику atopического дерматита. Инструкция предназначена для врачей-специалистов: врачей-иммунологов, врачей-аллергологов, врачей-генетиков, врачей лабораторной диагностики, иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с atopическим дерматитом в стационарных и амбулаторных условиях.

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и др.

Высокоскоростная микроцентрифуга (до 10000-12000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» 1,5 мл, твердотельный термостат, микроцентрифуга-вортекс, комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), насос с колбой-ловушкой, ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха, спектрофотометр для определения количества и качества выделенной ДНК, амплификатор ДНК, камера для горизонтального агарозного гель-электрофореза, источник питания с постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 200V, УФ-трансиллюминатор с фотокамерой для съемки в УФ свете.

Набор расходных материалов: резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 или 2 мл, пробирки с ЭДТА для забора крови, ПЦР-пробирки на 0,2 мл, штативы для пробирок на 1,5 мл и 0,2 мл, стеклянная химическая посуда и др.

Набор реагентов для пробоподготовки и проведения ПЦР включает в себя следующие компоненты: готовый коммерческий набор для экстракции ДНК из крови, буферный раствор для ПЦР, термостабильная ДНК-полимераза для «горячего старта» (Hot-start Taq-полимераза), 25 мМ MgCl₂, смесь НТФ, специфические олигонуклеотидные праймеры 10 мМ р-р, вода ПЦР-качества, компоненты для приготовления агарозного геля, буферных растворов для электрофореза, реагенты для окраски ДНК бромистым этидием.

Показания к применению

Заболевание или патологическое состояния, характеризующееся наличием не менее 3-х главных критериев, а также 3-х и более дополнительных, при минимальном сроке сохранения симптомов не менее 6 недель.

1. Главные диагностические критерии:

- кожный зуд;
- типичная морфология (основной первичный элемент – папуло/везикула + вторичные элементы) и локализация поражений кожи: у детей первых лет жизни – высыпания на лице и разгибательных поверхностях конечностей, у более старших детей и у взрослых – лихенификация и расчесы в области сгибов конечностей;
- хроническое рецидивирующее течение;
- начало заболевания в раннем детском возрасте (до 2-х лет);
- атопия в анамнезе или наследственная предрасположенность к атопии.

2. Дополнительные диагностические критерии:

- ксероз;
- ихтиоз/усиление рисунка на ладонях;
- реакции немедленного типа при кожном тестировании с аллергенами;
- повышенный уровень сывороточного IgE;

- эозинофилия в крови;
- частые инфекционные поражения кожи, в основном стафилококковой, грибковой и герпетической этиологии, связанные с ослаблением клеточного иммунитета;
- локализация кожного процесса на кистях и стопах;
- рецидивирующие конъюнктивиты;
- дополнительные суборбитальные складки Денни-Моргана;
- периорбитальная гиперпигментация, темные круги под глазами;
- катаракта, кератоконус;
- эритродермия;
- белый дермографизм.

Противопоказания для применения

Отсутствуют.

Описание технологии используемого метода

1 Материал для исследования и пробоподготовка

Материалом для выделения ДНК с целью анализа герминальной мутации 2282del4 гена FLG является цельная венозная кровь. Материал объемом 1 мл после забора переносится в центрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5 М ЭДТА (финальная концентрация 50 мМ). Выделение и очистка образцов ДНК осуществляется обычным доступным способом посредством соответствующих наборов реагентов.

Кратковременное хранение образцов ДНК (до 2 недель) осуществляется при температуре от +2⁰С до +8⁰С. Более длительное хранение проводится при температуре -20⁰С.

2 Проведение полимеразной цепной реакции

2.1 Специфические олигонуклеотидные праймеры

Анализ мутации 2282del4 гена FLG осуществляется в пределах 3 экзона гена FLG посредством аллельспецифической ПЦР. Для ее тестирования используются четыре олигонуклеотидных праймера (Таблица 1). Для проведения ПЦР используются одновременно все четыре праймера. Пара праймеров 2282del4_contr_F и 2282del4_contr_R в результате ПЦР продуцируют фрагмент 207 п.н., который должен выявляться при каждом тестировании в качестве внутреннего контроля, позволяющего оценить качество проведенной реакции. Пара праймеров 2282del4_mut_F и 2282del4_mut_R служат для проведения аллельспецифической реакции в случае присутствия в генотипе тестируемого пациента мутации 2282del4 гена FLG. Данные праймеры в результате ПЦР продуцируют фрагмент 158 п.н.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР

Ген	Мутация	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, п.н.
FLG	2282del4	2282del4_mut_F	AGAAGACTCAGACACACATTG	158
		2282del4_mut_R	GGGAGGACTCAGACTGTTT	
		2282del4_contr_F	ATTCTTTGTCCCTGGCAGT	207
		2282del4_contr_R	GACAGTTCCTCAAATGACAAGT	

2.2 Условия проведения полимеразной цепной реакции

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР буфер (200 мМ Трис-НСl pH 8,3, 200 мМ КCl, 50мМ (NH₄)₂SO₄), 1 мкл 10мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 1,25 мкл 50мМ MgCl₂, 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5 ед./мкл), 3 мкл образца ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. Для ПЦР необходимо использовать

специальные пробирки объемом 0,2 мл. ПЦР проводится в амплификаторе с подогреваемой крышкой.

Программа для амплификации всех анализируемых фрагментов ДНК выглядит следующим образом: начальная денатурация – 3 минуты при 95°C, затем 35 циклов 10 секунд денатурации при 95°C, отжиг праймеров – 10 секунд при 55°C и элонгация 20 секунд при 72°C. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72°C и охлаждение до 4°C.

3 Электрофоретическая детекция результатов ПЦР

3.1 Подготовка геля и буферных растворов

Детекция результатов амплификации осуществляется посредством агарозного гель-электрофореза и окраской бромистым этидием в электрофоретической камере для горизонтального агарозного гель-электрофореза.

Для проведения электрофоретического анализа необходимо приготовить четыре основных раствора реагентов. Для удобства использования изначально готовят концентрированные (стоковые) растворы, из которых затем путем добавления дистиллированной и деионизированной воды формируют рабочие растворы.

1. Подготовка стокового раствора 0,5М EDTA, pH = 8,0

Реагенты	Конц.	На 100 мл
EDTA	0,5 М	18,62 г
NaOH	~0,5 М	2,028 г
H ₂ O		88,95 мл

EDTA не растворяется в воде при кислом pH, поэтому при растворении нужно добавлять щелочь и контролировать pH. Хранить раствор при 4°C.

2. Подготовка трис-ЭДТА-боратного стокового раствора (20×)

Реагенты	Конц. 1×	Конц. 20×	Сток	На 500 мл
Трис	89 мМ	1,78 М	121,14 г/М	107,8 г
Борная кислота	89 мМ	1,78 М	61,83 г/М	55,03 г
EDTA 0,5М, рН 8.0	2 мМ	40 мМ	500 мМ	40 мл
H ₂ O				863,3 мл

Рабочий раствор 1× ТБЕ буфера готовят путем разведения 50 мл стокового раствора буфера (20×) до объема 1 литр дистиллированной водой. Затем добавляют 50 мкл стокового раствора бромистого этидия (1%).

3. Подготовка стокового раствора бромистого этидия 10 мг/мл (1%)

Реагенты	На 10 мл
Бромистый этидий	0,1 г
H ₂ O	до 10 мл

4. Подготовка стокового (4×) загрузочного буфера для образцов

Реагенты	Конц.	На 40 мл
Бромфеноловый синий 2%	0,05%	1 мл
Глицерин 100%	70%	28 мл
H ₂ O		11 мл

Для проведения электрофореза также могут быть использованы готовые коммерческие наборы для проведения электрофоретического фракционирования ДНК с последующей окраской бромистым этидием.

3.2 Проведение электрофореза

Процедура проведения электрофореза в стандартной камере для горизонтального агарозного электрофореза выглядит следующим образом:

1. Агарозу для электрофореза в количестве 1,7 г поместить в термостойкую стеклянную колбу на 250 мл. Добавить 100 мл рабочего

раствора 1× ТБЕ буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного расплавления агарозы (2 мин.).

2. Залить расплавленную агарозу в специальную форму и установить гребенки в пазы на кювете.

3. Через 20 мин. после полной полимеризации геля извлечь гребенки, не повреждая лунки. Поместить кювету с гелем в камеру для электрофореза. Залить в камеру для электрофореза рабочий раствор 1× ТБЕ буфера так, чтобы слой буфера на 5 мм покрывал гель.

4. Добавить к каждому образцу (25 мкл амплификационной смеси) по 8 мкл 4× загрузочного буфера. Перемешать пипетированием.

5. Через слой буфера в отдельные лунки внести пипеточным дозатором по 10 мкл смеси ампликонов и загрузочного буфера, положительный, отрицательный контроли и маркер молекулярного веса.

6. Закрывать электрофоретическую камеру защитной крышкой и подключить электрофоретическую камеру к источнику питания, соблюдая полярность подключения.

7. Электрофорез проводить при 170 В в течение 40 минут.

8. Результаты электрофоретического фракционирования регистрируются визуально посредством любого оборудования, предназначенного для просмотра электрофоретических гелей, окрашенных бромистым этидием, в УФ свете.

4 Интерпретация результатов анализа

Результат тестирования признается положительным при наличии на электрофореграмме дополнительной фракции, соответствующей по молекулярному весу аллельспецифическому фрагменту (158 п.н.). Примеры электрофоретической детекции мутации 2282del4 гена FLG

представлены на рисунке 1. Для лучшей визуализации изображение представлено в инвертированном виде.

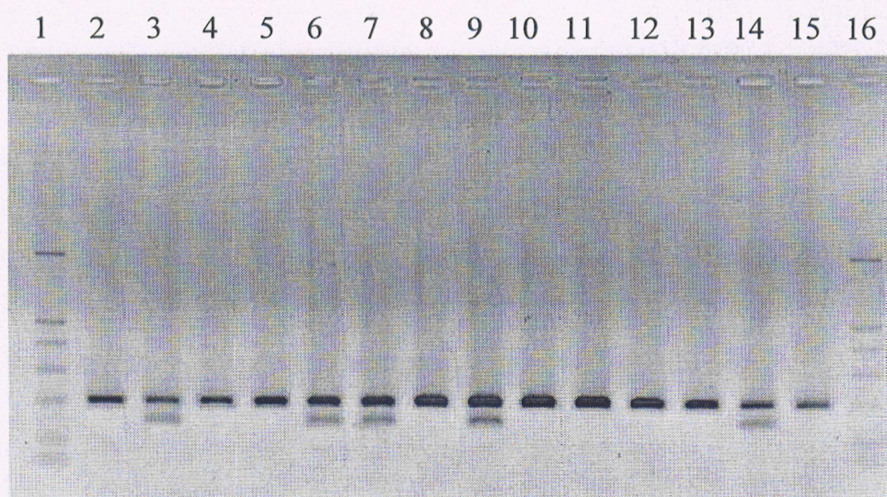


Рисунок 1 – Электрофоретическая детекция герминальной мутации 2282del4 гена FLG методом аллельспецифической полимеразной цепной реакции в 1,7% агарозном геле. Дорожки 2, 4, 5, 8, 10-13 и 16 – образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 3, 6, 7, 9 и 14 – образцы, содержащие мутацию 2282del4 гена FLG, дорожки 1 и 16 – маркер молекулярного веса (50, 100, 200, 300, 400, 500 и 1000 п.н.)

Эта информация используется врачом-аллергологом в комплексе с данными клинических, лабораторных и инструментальных видов исследований для персонифицированного подхода к лечению и медицинской профилактике аллергических заболеваний.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

В процессе выполнения молекулярно-генетического анализа наиболее распространенным признаком методических нарушений является слабая амплификация исследуемых фрагментов ДНК либо отсутствие амплификации. Это проявляется в виде нечетких фракций либо в их отсутствии после окраски электрофоретических гелей. Причин неудовлетворительных результатов может быть несколько. Основными из них являются низкая либо крайне высокая концентрация исходного

образца ДНК (оптимальная концентрация должна быть в пределах 10-50 нг/мкл), неправильно составленная программа амплификации, ошибки последовательности нуклеотидов в олигонуклеотидных праймерах, применяемых в ПЦР, использование реагентов с истекшим сроком годности.

При проведении электрофоретической детекции для получения более четкого фракционирования следует использовать только свежеприготовленные буферные растворы и избегать перегрева электрофоретической камеры.