МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневич
«___» _____2016 г.
Регистрационный № 156-1115

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННО ОБУСЛОВЛЕННОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ:
к.б.н. Силин А.Е., к.м.н. Коротаев А.В., Мартинков В.Н., Силина А.А., Тропашко И.Б., Мартыненко С.М., Кривун Т.П.

Гомель, 2015

Перечень использованных сокращений:

LDLR – ген рецептора липопротеинов низкой плотности (low density lipoprotein receptor);

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

НТФ – нуклеотидтрифосфаты;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИБС – ишемическая болезнь сердца;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

SSCP – метод анализа конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (single-stranded conformation polymorphism);

TEMED – тетраметилэтилендиамин (tetramethylethylenediamine);

APS – персульфат аммония (ammonium persulfate).

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярно-генетического анализа полной кодирующей последовательности гена рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) с целью выявления наличия клинически значимых мутаций и генетических полиморфизмов, связанных с высоким риском развития наследственной гиперхолестеринемии. Предназначен для следующих врачей-специалистов: врачи-генетики, врачи-кардиологи, врачи-терапевты, врачи лабораторной диагностики.

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и др.

Высокоскоростная микроцентрифуга (до 10 000-12 000×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 или вертикального полиакриламидного гель-электрофореза, источник питания постоянным током с характеристиками, позволяющими поддерживать параметры тока не ниже 600V, камера для окраски гелей с использованием нитрата серебра, генетический анализатор (секвенатор).

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, 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 Taq-полимераза), 25 мМ

$MgCl_2$, смесь НТФ, специфические олигонуклеотидные праймеры 10 мМ р-р, вода ПЦР-качества, компоненты для приготовления полиакриламидного геля, буферных растворов для электрофореза, реагенты для окраски гелей нитратом серебра, комплект реагентов для секвенирования фрагментов ДНК методом Сенгера.

Показания к применению

1. Наличие клинических признаков семейной гиперхолестеринемии (МКБ 10: Е78.0; Е78.2; Е78.4; Е78.5; Е78.8; Е78.9): дебют ИБС (МКБ 10: I20-I25) в возрасте 30-40 лет; уровень общего холестерина >7 ммоль/л; уровень липопротеинов низкой плотности >4 ммоль/л; туберозные ксантомы (МКБ 10: Е78.2), ксантелазмы, липоидная дуга роговицы; наличие у пациента родственников первой или второй степени родства с аналогичной патологией.

2. Каскадный генетический скрининг кровных родственники пациентов, у которых выявлен генетический дефект.

Противопоказания для применения

Отсутствуют.

Описание технологии используемого метода

1 Материал для исследования и пробоподготовка

Материалом для выделения ДНК с целью анализа мутаций и генетических полиморфизмов гена LDLR 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 (+2^{0}С) до (+8^{0}С). Более длительное хранение проводится при температуре (-20^{0}С).

2 Проведение полимеразной цепной реакции

2.1 Специфические олигонуклеотидные праймеры

Анализ мутаций и генетических полиморфизмов гена LDLR осуществляется в пределах 1-18-го экзонов, а также в промоторной области. Для амплификации фрагментов ДНК, в пределах которых локализованы исследуемые генетические варианты, используются пары специфических олигонуклеотидных праймеров. Их основные характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР

№ п/п	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, п.н.	Температура отжига, Сº
1	LDLR_Pr_F	CAGCTCTTCACCGGAGACC	278	54
2	LDLR_Pr_R	ACCTGCTGTGTCCTAGCTGG		
3	LDLR_1_F	CACATTGAAATGCTGTAAATGACG	215	58
4	LDLR_1_R	CTATTCTGGCGCCTGGAGCAAGC		
5	LDLR_2_F	TTGAGAGACCCTTTCTCCTTTTCC	184	59
6	LDLR_2_R	TGCATATCATGCCCAAAGGGG		
7	LDLR_3_F	TTCCTTTGAGTGACAGTTCAATCC	196	56
8	LDLR_3_R	GATAGGCTCAATAGCAAAGGCAGG		
9	LDLR_4A_F	GTTGGGAGACTTCACACGGTGATGG	356	62
10	LDLR_4A_R	ACTTAGGCAGTGGAACTCGAAGGCC		
11	LDLR_4B_F	CCCCAGCTGTGGGCCTGCGACAACG	269	62
12	LDLR_4B_R	GGGGGAGCCCAGGGACAGGTGATAG		
13	LDLR_5_F	AGAAAATCAACACACTCTGTCCTG	180	58
14	LDLR_5_R	GGAAAACCAGATGGCCAGCG		
15	LDLR_6_F	TCCTCCTTCCTCTCTCTGGC	179	56
16	LDLR_6_R	TCTGCAAGCCGCCTGCACCG		
17	LDLR_7_F	GGCGAAGGGATGGGTAGGGG	236	57
18	LDLR_7_R	GTTGCCATGTCAGGAAGCGC		
19	LDLR_8_F	CATTGGGGAAGAGCCTCCCC	220	66
20	LDLR_8_R	GCCTGCAAGGGGTGAGGCCG		
21	LDLR_9_F	CCCCTGACCTCGCTCCCCGG	224	66
22	LDLR_9_R	GCTGCAGGCAGGGGCGACGC		
23	LDLR_10_F	ATGCCCTTCTCTCCTCCTGC	278	58
24	LDLR_10_R	AGCCCTCAGCGTCGTGGATA		
25	LDLR_11_F	TCCTCCCCCGCCCTCCAGCC	194	66
26	LDLR_11_R	GCTGGGACGGCTGTCCTGCG		
27	LDLR_12_F	GCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT	209	56
28	LDLR_12_R	CACCTAAGTGCTTGCATCTCGTACG		

Продолжение таблицы 1

№ п/п	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5’-3’	Длина фрагмента, п.н.	Температура отжига, С°
29	LDLR_13_F	GTCATCTTCCTTGCTGCCTG	217	62
30	LDLR_13_R	TTCCACAAGGAGGTTTCAAGGTTGGGGGGG		
31	LDLR_14_F	AAATTTCTGGAATCTTCTGG	288	59
32	LDLR_14_R	GCAGAGAGAGGCTCAGGAGG		
33	LDLR_15_F	CCTGACTCCGCTTCTTCTGCCCCAG	203	60
34	LDLR_15_R	CGCAGAAACAAGGCGTGTGCCACAC		
35	LDLR_16_F	CCTTCCTTTAGACCTGGGCC	173	58
36	LDLR_16_R	CATAGCGGGAGGCTGTGACC		
37	LDLR_17_F	GGGTCTCTGGTCTCGGGGGC	240	58
38	LDLR_17_R	GGCTCTGGCTTTCTAGAGAGGG		
39	LDLR_18_F	TCCGCTGTTTACCATTTGTTGGCAG	126	57
40	LDLR_18_R	AATAAAACAAGGCCGGCGAGGTCTC		

2.2 Условия проведения полимеразной цепной реакции

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 2,5 мкл 10х Hot Start ПЦР буфер (200 мМ Трис-HCl pH 8,3, 200 мМ KCl, 50мМ $(NH_4)_2SO_4$), 1 мкл 10мМ смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 2,5 мкл 25мМ $MgCl_2$, 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5 ед./мкл), 1 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 анализируемых фрагментов ДНК выглядит следующим образом: начальная денатурация – 5 мин. при 95°С, затем 35 циклов 1-минутной денатурации при 95°С, отжиг праймеров – 1 мин. при соответствующей температуре (Таблица 1) и элонгация 2 мин. при 72°С. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72°С и охлаждение до 4°С.

3 Электрофоретическая детекция результатов ПЦР

Предлагаемый метод выявления мутаций и генетических полиморфизмов гена LDLR основан на методе анализа однонитевого конформационного полиморфизма (SSCP). Этот метод позволяет выявлять наличие нуклеотидных замен, делеций и инсерций на протяжении всей длины амплифицированного продукта. Метод SSCP заключается в следующем: продукт амплификации денатурируют, и полученные однонитевые молекулы разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

3.1 Подготовка геля и буферных растворов

Электрофорез осуществляется в горизонтальной или вертикальной камере для полиакриламидного гель-электрофореза. Ниже описан метод постановки полиакриламидного неденатурирующего гель-электрофореза в горизонтальной камере с принудительным охлаждением.

Для приготовления геля и проведения электрофореза необходимо предварительно приготовить несколько растворов (Табл. 2).

Таблица 2 – Состав основных растворов для проведения электрофореза

Раствор/компонент	К-во
Акриламид:бис-акриламид (Т = 30 %, С = 2 %)	
акриламид	29,4 г
бис-акриламид	0,6 г
Вода дистиллированная и деионизированная (д/д)	до 100 мл
Акриламид:бис-акриламид (Т = 30 %, С = 3 %)	
акриламид	29,1г
бис-акриламид	0,9 г
Вода (д/д)	до 100 мл

Продолжение таблицы 2

Гелевый буфер 0,448 М Трис-ацетат pH 6,4 (4х концентр.)	
Трис	5,4 г
Уксусная кислота (лед.)	до pH 6,4
Вода (д/д)	до 100 мл
Анодный буфер 0,45 М Трис-ацетат pH 8,4	
Трис	27,3 г
Вода (д/д)	400 мл
Уксусная кислота (лед.)	до pH 8,4
Вода (д/д)	до 500 мл
Катодный буфер 0,08 М Трис/0,8 М Трицин	
Трис	4,9 г
Трицин	71,7 г
Вода (д/д)	до 500 мл
Раствор персульфата аммония (APS) 40%	
Персульфат аммония	400 мг
Вода (д/д)	до 1 мл
Загрузочный буфер	
Гелевый буфер	3,0 мл
Бромфеноловый синий 1%	100 мкл
ЭДТА 0,2 М	250 мкл
Вода (д/д)	до 25 мл

Полиакриламидные гели для проведения электрофореза готовят на поддерживающей пленке из полиэстера при помощи специального дополнительного набора аксессуаров (рис. 1), включающего два стекла с прокладкой для формирования толщины геля и зажимы для скрепления стекол во время полимеризации.

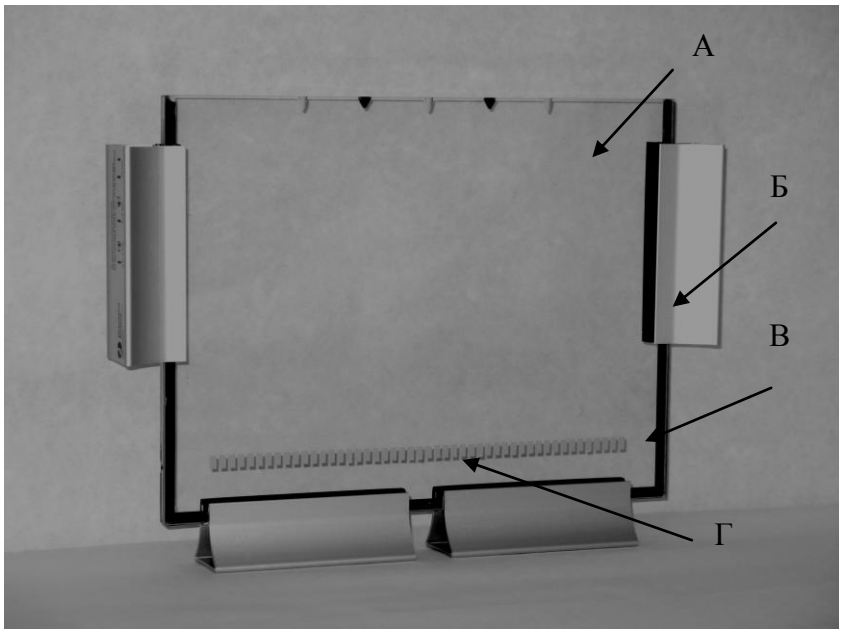

Рисунок 1 – Стенд для приготовления полиакриламидных гелей в собранном виде: А – стекла; Б – зажим для скрепления стекол во время полимеризации геля; В – прокладка уплотнительная, определяющая толщину геля; Г - наклейки для формирования загрузочных лунок

При помощи данного стенда готовят гель с размерами 25х14 см и 1 мм толщиной. Для приготовления одного геля используются компоненты в пропорциях, указанных в Таблице 3.

Концентрирующий гель заливается в первую очередь, а затем на концентрирующий гель наслаивается разделяющий гель. Стенд для приготовления геля предварительно охлаждают в холодильной камере. По истечении 2 часов после заливки гель готов к проведению электрофореза.

Таблица 3 – Состав реагентов для формирования одного полиакриламидного геля

Компоненты геля	Концентрирующий гель, Т=4%, С=3%	Разделяющий гель, Т=12%, С=2%
Глицерин	2,0 мл	0,5 мл
Акриламид:бис-Акриламид Т=30%, С= 2%	-	10,0 мл
Акриламид:бис-Акриламид Т=30%, С= 3%	1,3 мл	-
Гелевый буфер	2,5 мл	6,3 мл
Вода (д/д)	4,2 мл	8,3 мл
TEMED	6,0 мкл	14,0 мкл
APS 40% (добавляется непосредственно перед заливкой геля)	15,0 мкл	35,0 мкл

3.2 Проведение электрофоретического фракционирования

Для проведения SSCP-анализа следующим после ПЦР является этап денатурации продуктов амплификации с целью получения однонитевых фрагментов ДНК. Для этого в пробирку с продуктами амплификации добавляется формамид, содержащий краситель бромфеноловый синий (на 25 мл формамида 10 мг бромфенолового синего) в пропорции 1:2. Затем пробирку помещают в термостат на 5 мин. при температуре 98°С. По окончании этого этапа пробирку быстро перемещают в кювету с ледяной водой на 5 мин. и непосредственно после этого образцы наносят в загрузочные лунки геля объемом 7 мкл пипеточным дозатором с индивидуальными наконечниками для каждого образца (рис. 2).

Для оценки молекулярного веса анализируемых фрагментов в одну из свободных лунок вносится образец маркера молекулярного веса. Наиболее удобными являются маркеры с фрагментами от 50 до 800-1000 пар нуклеотидов с шагом в 50 пар нуклеотидов.

Для осуществления контакта электродов с гелем используются буферные полоски из трехслойной фильтровальной бумаги шириной 5 см, которые накладываются по всей ширине, захватывая 2 см геля с катодной и анодной стороны (рис. 2). Бумага пропитывается 15 мл соответствующего

электродного буфера (Табл. 2). После накладывания электродов на буферные полоски электрофоретическая камера подсоединяется к источнику питания. Начальными параметрами тока для проведения электрофореза с использованием вышеописанного геля являются 600 В/100 мА/30 Вт. Электрофоретическое фракционирование осуществляется в течение 1 ч. 45 мин. при температуре рабочей поверхности камеры 15^0С.

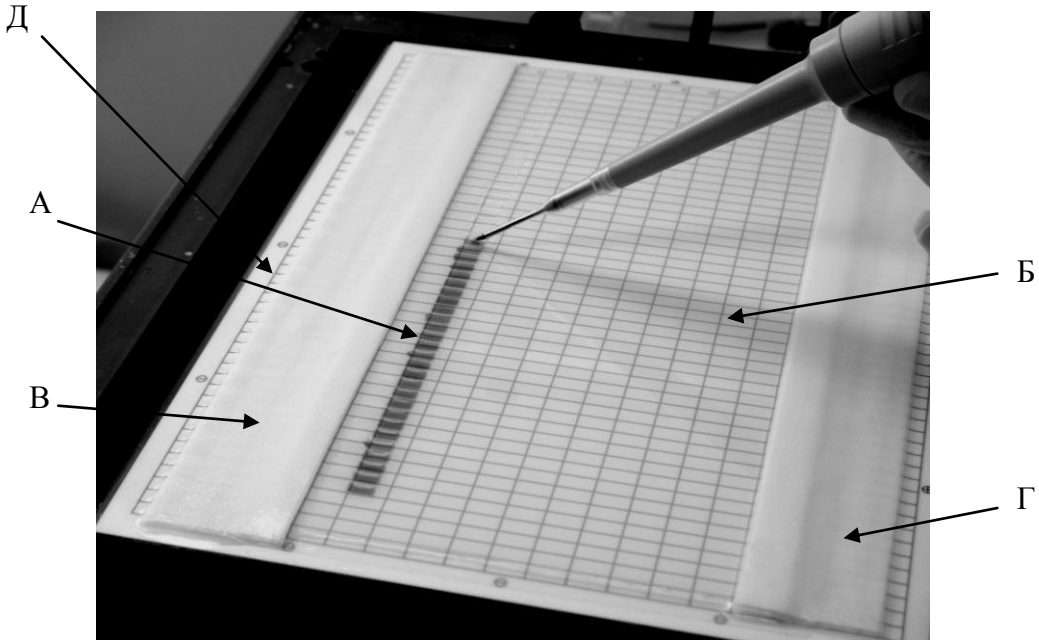

Рисунок 2 – Расположение геля в электрофоретической камере и нанесение образцов: А – лунки с образцами; Б – гель; В – катодная буферная полоска; Г - анодная буферная полоска; Д – охлаждаемая рабочая поверхность электрофоретической камеры с керамическим покрытием

Контроль процесса электрофореза осуществляется визуально по мере продвижения синей бромфеноловой метки от катода к аноду. Электрофорез прекращается, когда метка находится в 1 см от анодной буферной полоски.

3.3 Окраска геля с использованием нитрата серебра

Окраска геля с использованием нитрата серебра может осуществляться как вручную, так и в специальной камере. Процесс окрашивания протекает в 5 этапов. Объем раствора для каждого из этапов составляет 200 мл. В таблице 4 представлены составы окрашивающих растворов и время инкубации геля на каждом из этапов.

Таблица 4 – Состав растворов и время инкубации на каждом из этапов окраски полиакриламидного геля с использованием нитрата серебра

Этап/раствор	К-во реагента/время
I этап – Фиксирующий раствор	
Натриевая соль сульфобензоловой кислоты	1,25 г (0,7%)
Этиловый спирт	50 мл (24%)
Серная к-та (конц.)	0,5 мл (до pH 1,0)
Вода (д/д)	до 200 мл
Время инкубации	40 мин.
II этап – Окрашивающий раствор	
Нитрат серебра	0,4 г (0,2%)
Натриевая соль сульфобензоловой кислоты	0,14 г (0,07%)
Вода (д/д)	до 200 мл
Время инкубации	40 мин.
III этап – Промывка	
Вода (д/д)	200
Время инкубации	2 мин.
Этап/раствор	К-во реагента/время

Продолжение таблицы 4

IV этап – Проявляющий раствор	
Карбонат натрия	5 г (2,5%)
Формальдегид 37% (вносить непосредственно перед окраской)	0,4 мл (0,074%)
Тиосульфат натрия 2% (вносить непосредственно перед окраской)	0,4 мл (0,2%)
Вода (д/д)	до 200 мл
Время инкубации	5-7 мин. до появления четких фракций ДНК
V этап – Остановка реакции и консервация геля	
Уксусная к-та (лед.)	2 мл (1%)
Ацетат натрия	10 г (5%)
Глицерин	20 г (10%)
Вода (д/д)	до 200 мл
Время инкубации	40 мин.

При выявлении фактов однонитевого конформационного полиморфизма или наличия гетеродуплексного паттерна образцы ДНК секвенируются с использованием генетического анализатора капиллярного типа по методу Сенгера. Секвенирующая реакция осуществляется как с прямым, так и с обратным праймером (Табл. 1) с использованием реагентов из набора для секвенирования.

Интерпретация результатов анализа

При проведении генетического тестирования обязательно включение в серию тестов отрицательного контроля в виде образца ДНК без мутаций. Это необходимо для проведения визуального анализа паттернов (пространственного расположения фракций на геле) в зоне однонитевой ДНК. Кроме изменения паттернов в области однонитевой ДНК, обычно харак-

терных для однонуклеотидных замен, могут наблюдаться гетеродуплексные паттерны в виде дополнительных медленно мигрирующих фракций в зоне двухнитевой ДНК. Гетеродуплексные фракции часто формируются при наличии инсерции или делеции нуклеотидов. Любое отличие анализируемого паттерна от контрольного является основанием для последующего секвенирования данного образца ДНК с целью расшифровки его нуклеотидной последовательности.

Наиболее характерные паттерны, свидетельствующие об измененной структуре ДНК, схематично представлены на рисунке 3.

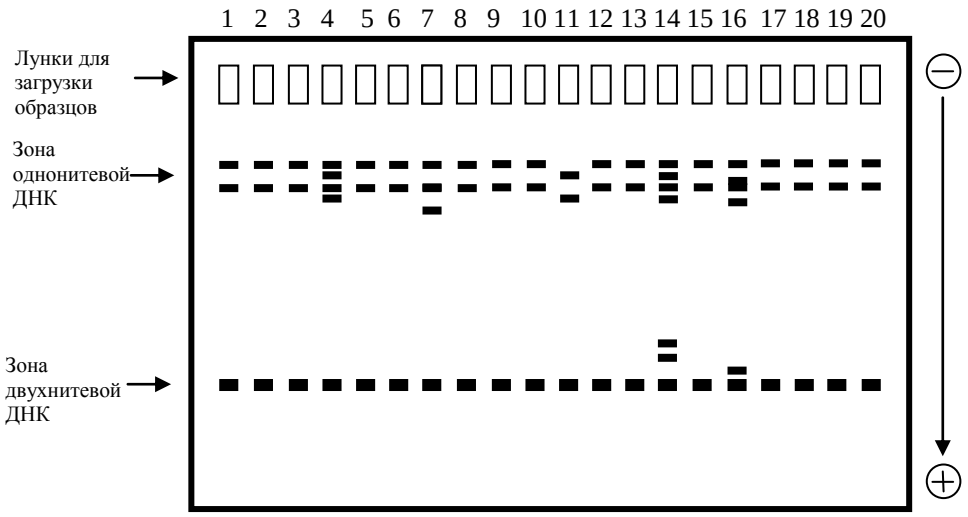

Рисунок 3 – Схематическое изображение полиакриламидного геля после окраски нитратом серебра с типичными проявлениями конформационного полиморфизма. Дорожки 4, 7, 11, 14, 16 – примеры измененных паттернов в области однонитевой ДНК. Дорожки 14 и 16 – примеры типичных гетеродуплексных паттернов

Результаты секвенирования анализируются посредством сравнения выявленной измененной последовательности ДНК с базами данных, находящимися в открытом доступе сети Интернет (OMIM, dbSNP, LOVD v.2.0).

Описанный метод молекулярно-генетического анализа является частью комплексного диагностического обследования пациентов с подозрением на семейную гиперхолестеринемию.

Алгоритм диагностики пациентов с подозрением на семейную гиперхолестеринемию представлен на рисунке 4.

Рисунок 4 – Алгоритм диагностики пациентов с подозрением на семейную гиперхолестеринемию

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 в последовательности нуклеотидов используемых в ПЦР олигонуклеотидных праймеров, использование реагентов с истекшим сроком годности.