

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



Д.Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный №228-1215

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА
rs8099917 И rs12979860 В ГЕНЕ IL28B

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: к.б.н. Гасич Е.Л., д.м.н. Еремин В.Ф., Домнич М.В.,
Немира А.С.

Минск, 2015

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

21.12.2015

Регистрационный № 228-1215

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО
ПОЛИМОРФИЗМА rs8099917 И rs12979860 В ГЕНЕ IL28B**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: к.б.н. Гасич Е.Л., д.м.н. Еремин В.Ф., Домнич М.В.,
Немира А.С.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод секвенирования участка гена IL28B, позволяющего определить однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в аллелях rs8099917 и rs12979860, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение и исходы терапии интерфероном и рибавирином пациентов, инфицированных вирусом гепатита С (ВГС).

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ВГС-инфекцией.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ

Оборудование и материалы для сбора клинических образцов

Вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови.

Оборудование для проведения ПЦР и секвенирования

1. Термоциклер.
2. Центрифуги с охлаждением на 14000 об/мин.
3. Центрифуга типа «Эппендрф».
4. ПЦР боксы.
5. Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания.
6. Гельдокументирующая система.
7. 3 комплекта автоматических дозаторов.
8. Вортекс.
9. Твердотельный термостат.
10. Генетический анализатор.
11. Морозильник с температурой -20°C .
12. Пластиковые пробирки (1,5 мл, 0,2 мл, 2 мл) и наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов (1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл).

Реагенты для проведения ПЦР и секвенирования

1. Праймеры.
2. Реагенты для выделения тотальной ДНК человека из образцов клинического материала.
3. Реагенты для проведения ПЦР (Taq-полимераза с 10x буфером, Mg^{2+} , смесь дезоксинуклеотидов, деионизованная вода).
4. Реагенты для проведения секвенирующей ПЦР (праймеры, BigDye Terminator v.3.1, 5x буфер, деионизованная вода).
5. HiDi Formamid.
6. Агароза.
7. Маркер молекулярного веса.
8. Колонки для очистки продуктов ПЦР.
9. Реагенты для очистки продуктов после секвенирующей ПЦР (смесь нуклеаз и фосфатаз).
10. Стандартное программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Вирус гепатита С, устойчивый или чувствительный к действию интерферона и рибавирина.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАННОГО МЕТОДА

Метод основан на экстракции тотальной ДНК человека из образцов клинического материала и проведении ПЦР-амплификации с детекцией методом электрофореза фрагментов ДНК человека, содержащих SNP rs8099917 и rs12979860 в гене. Полученные фрагменты ДНК секвенируются и выполняет-

ся биоинформационный анализ, позволяющий дифференцировать гомо- и гетерозиготное состояние по каждому из исследуемых SNP.

1. Правила забора, транспортировки и хранения клинических образцов.

Забор крови с ЭДТА и ее пробоподготовку осуществляют общепринятыми методами.

2. Молекулярно-генетические исследования SNP rs8099917 и rs12979860 в гене IL28B

Выделение тотальной ДНК человека. Выделение тотальной ДНК человека из клинических образцов проводится в соответствии с инструкцией коммерческой тест-системы, предназначенной для выделения тотальной ДНК человека.

Аmplификация по участку SNP rs8099917 в гене IL28B.

Для проведения гнездовой ПЦР используются пары праймеров, специфичные для участка гена, кодирующего SNP rs8099917 в гене IL28B (указаны позиции по отношению к референсной последовательности гена IL28B (интерферон лямбда 3 AC011445):

для проведения ПЦР используются следующие пары праймеров:

F 17 5'-AAGTAACACTTGTTCCTTGTAAGATTC-3' (поз. 33388 -33410)

R 17 5'-TTGCATTCTCCACATCTTAAATTATAGCG-3' (поз. 33782-33751)

В состав реакционной смеси (25 мкл), необходимой для исследования одного образца ДНК, входят следующие компоненты: 10x буфер для полимеразы 2,5 мкл, 25 mM MgCl₂ в конечной концентрации 2,0 mM, смесь трифосфатов в конечной концентрации 0,2 mM, праймеры 17 F и 17R в концентрации 0,5 пикомоль на одну реакцию, Taq-полимераза 0,04 U. В качестве отрицательного контроля используется деионизованная вода.

Аmplификация проводится в следующем режиме: 95°C – 5 мин; 95°C – 90 сек, 55°C – 90с, 72°C – 2 мин (35 повторов); 72°C – 5 минут. Размер амплифицированного продукта составляет 394 п.н. (рис. 1).

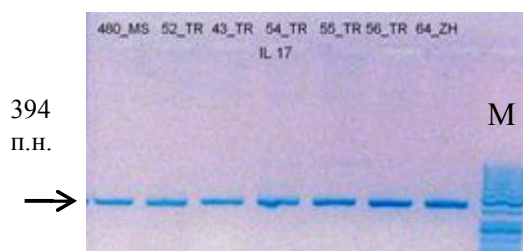


Рисунок 1 - Результаты электрофоретической детекции SNP rs8099917 в гене IL28B (480_MS, 52_TR, 43_TR, 54_TR, 55_TR, 56_TR, 64_ZH – исследуемые образцы, М – маркер молекулярного веса)

Аmplификация по участку SNP rs12979860 в гене IL28B

Для выявления SNP rs12979860 в гене IL28B используются следующие пары праймеров:

F60 5'-GCTTATCGCATACGGCTAGG-3' (поз. 29114-29124)

R60 5'-AGGCTCAGGGTCAATCACAG-3' (поз. 29326-29320)

Размер амплифицированного продукта составляет 212 п.н.

В состав реакционной смеси (25 мкл), необходимой для исследования одного образца ДНК, входят следующие компоненты: 10x буфер для полимеразы 2,5 мкл, 25 mM MgCl₂ в конечной концентрации 2,0 mM, смесь трифосфатов в конечной концентрации 0,2 mM, праймеры 17 F и 17R в концентрации 0,5 пикомоль на одну реакцию, Taq-полимераза 0,04 U. В качестве отрицательного контроля используется деионизованная вода.

Режим амплификации: 95°C – 5 мин; 95°C – 90 с, 58°C – 90с, 72°C – 2 мин (35 повторов); 72°C – 5 мин. Размер продуктов амплификации определяют с помощью маркера молекулярного веса ДНК 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н. (рис. 2).

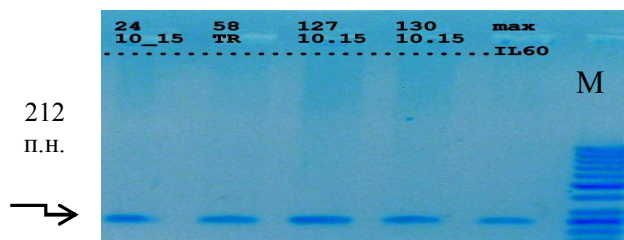


Рисунок 2 – Результаты электрофоретической детекции rs8099917 в гене IL28B (24_1015, 58_TR, 127_1015, 130_1015 – исследуемые образцы, М – маркер молекулярного веса)

Секвенирующая ПЦР.

Специфические ампликоны очищают после ПЦР стандартными методами и проводят секвенирующую ПЦР.

Состав реагентов:

- Big Dye terminator v.3.1;
- BD Dilution Buffer для ABI генетического анализатора;
- прямой (F17) и обратный праймеры (R17) концентрацией 10 пикомоль для определения SNP rs8099917 в гене IL28B;

прямой (F60) и обратный праймеры (R60) концентрацией 10 пикомоль для определения SNP 12979860 в гене IL28B.

- амплифицированный и очищенный образец;
- деионизованная вода.

Работа проводится на льду!

Секвенирующая ПЦР в объеме 20 мкл по следующей прописи: 4,0 мкл прямого или обратного праймера (10 пикомоль), 1 мкл Bigdye terminator v.3.1, 1,5 мкл ПЦР продукта (концентрация 10 нг), 7 мкл Bigdye буфера, 6,5 мкл деионизованной воды. Режим амплификации: 96°C – 5 мин; 95°C – 10 сек, 50°C – 5с, 60°C – 2 мин (25 повторов); 4°C – хранение.

Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от не включенных нуклеотидов методом преципитации.

Секвенирование продуктов ПЦР.

К очищенной пробе добавить по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешать 5 сек на вортексе, сбросить кратким центрифугированием капли со стенок эппендорфов. Поместить пробирки в термостат при 95°C на 2 минуты. Немедленно образцы поместить на лед. Подготовленные пробы внести по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

Определение SNP rs809917 и rs12979860 в гене IL28B

Выполнить биоинформационный анализ результатов секвенирования с помощью стандартного программного обеспечения. Для определения SNP используются референсные нуклеотидные последовательности интерферона лямбда 3, полученных из Международной базы данных GenBank (рис.3, 4).

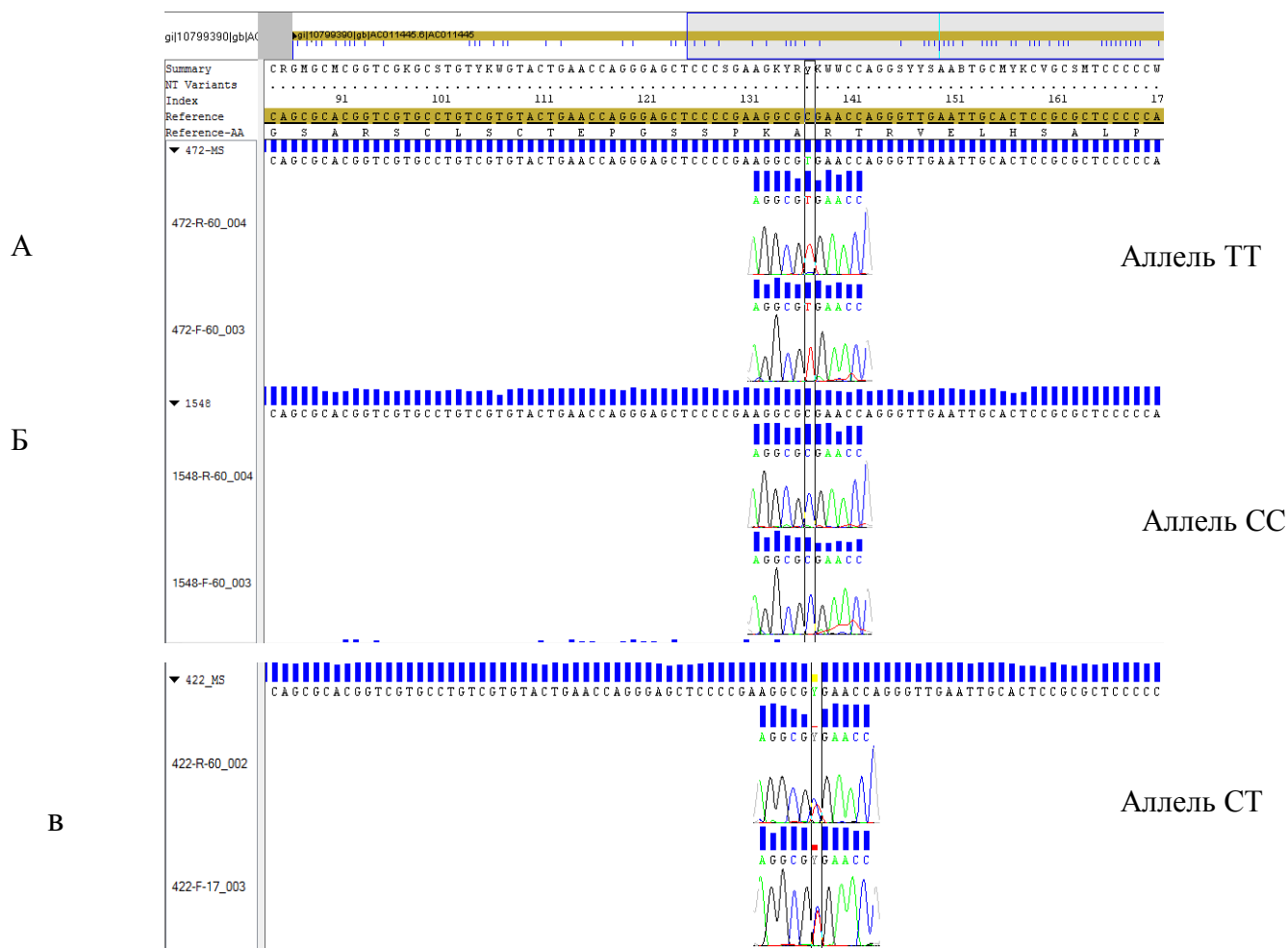


Рисунок 3 – Варианты SNP rs12979860 (поз. 136 по отношению к референсной последовательности AC011445) в гене IL28B. А- вариант SNP ТТ, Б- вариант SNP СС, В- вариант SNP СТ

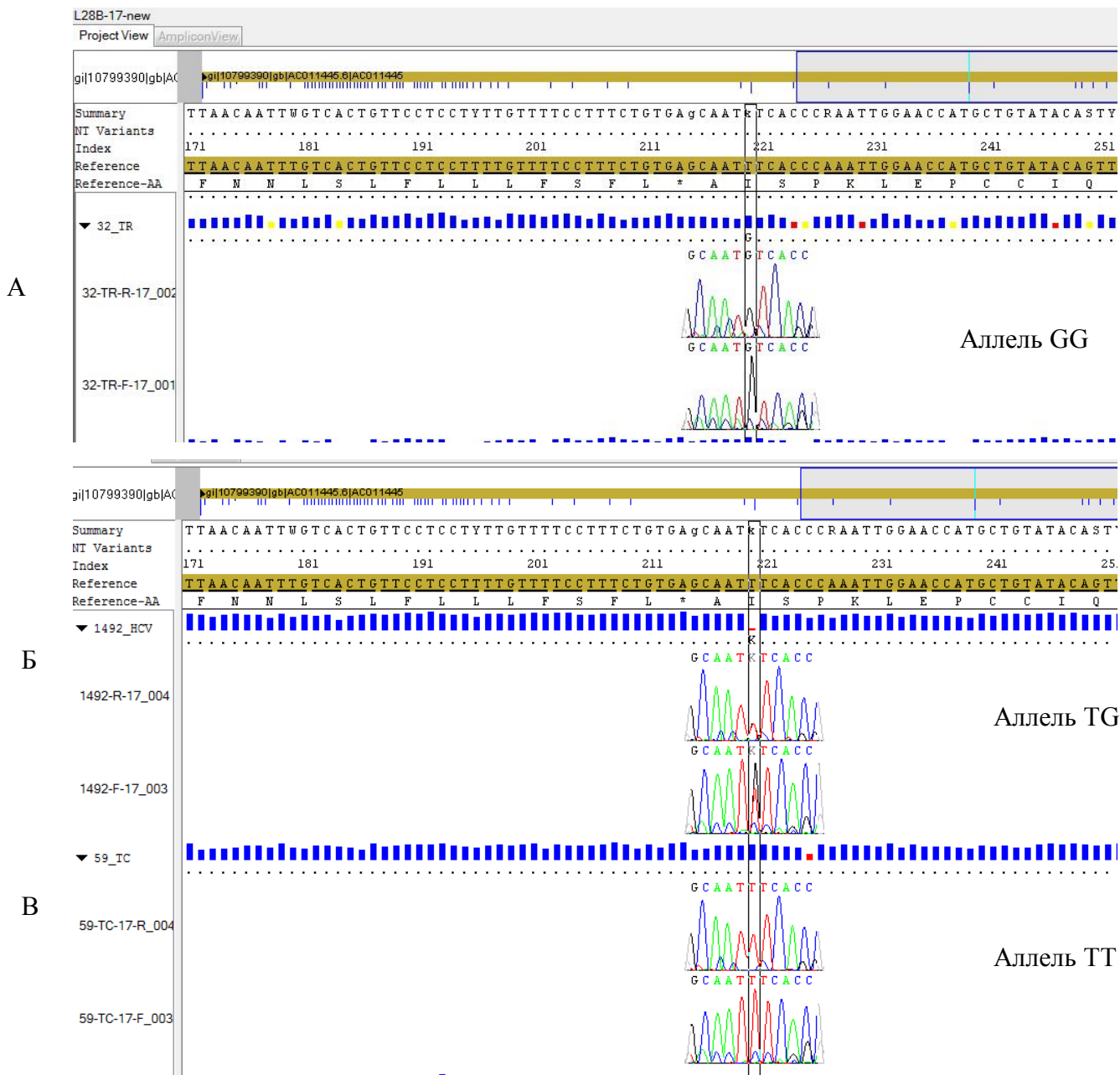


Рисунок 4 – Варианты SNP rs8099917 (поз. 219 по отношению к референсной последовательности AC011445) в гене IL28B. А- вариант SNP GG, Б- вариант SNP TG, В- вариант SNP TT

Представленный метод позволяет определить аллельные варианты CC (rs 12979860) и TT (rs8099917), являющиеся прогностически благоприятными, а так же варианты CT, TT (rs 12979860) и GT, GG (rs8099917), которые являются аллелями риска и ассоциированы с низким уровнем ответа на терапию вируса гепатита С пегилированным интерфероном и рибавирином.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и путей устранения

Все реакции отрицательные, включая положительный контроль	Пропущен компонент ПЦР смеси, задан неправильный режим амплификации, использованы реагенты с истекшим сроком годности
Ампликон в отрицательной пробе	Реагенты контаминированы