

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
“ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2014 г.

Регистрационный №252-1213

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ  
ВИРУСА ГЕПАТИТА С**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Е.Л. Гасич, д.м.н. В.Ф. Еремин, С.В. Сосинович,  
к.м.н. М.А. Черновецкий, И.Г. Лукьяненко, М.Г. Тулинова

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод секвенирования участков генов core/E1 и NS5, позволяющего определить подгенотип и циркулирующие рекомбинантные формы (ЦРФ) вируса гепатита С (ВГС), установить их филогенетические связи. Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и врачей-эпидемиологов.

## 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  $-20^{\circ}\text{C}$
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 обратной транскрипции (рэндом гексамеры, обратная транскриптаза, ингибитор РНКаз, 5x буфер, смесь дезоксинуклеотидов, деионизованная вода).
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. Комплект реагентов для выделения РНК ВГС любого производителя.

*Стандартное программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей типа SeqScape, BioEdit, MEGA 4.*

### ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНОГО МЕТОДА

Для определения подгенотип и ЦРФ ВГС проводится секвенирование ПЦР-амплифицированной области генов core/E1 и NS5 и их филогенетический анализ.

#### *1. Правила забора, транспортировки и хранения клинических образцов.*

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в вакутайнер. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с ан-

тикоагулянтом. (NB! В противном случае кровь свернется и выделение ДНК/РНК станет невозможным!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10-20 минут при 3000 об/мин, после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Образцы плазмы крови желательно разлить небольшими (0,1-0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Образцы, предназначенные для длительного хранения, отбирают в пробирки на 2 мл с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия хранения материала:

- образцы цельной крови: при температуре 20-25°C – в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре 2-8°C – не более одних суток;

- образцы плазмы крови: при температуре 2-8°C – в течение 5 суток; при температуре минус 16-20°C – в течение года.

*Недопустимо замораживание образцов цельной крови!*

Транспортирование пробирок с кровью и микропробирок с плазмой осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом при температуре плюс 2 - 8°C. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

Забор крови и ее транспортировка производится согласно руководству «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 1-4 групп патогенности» № 11-7-13-2002, утвержденному Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 30.12.2002.

2. Молекулярно-генетические исследования с целью определения подгепатита и циркулирующих рекомбинантных форм ВГС.

*Выделение РНК ВГС.* Выделение РНК ВГС из сыворотки/плазмы проводится в соответствии с инструкций коммерческой тест-системы, предназначенной для выделения РНК из плазмы/сыворотки крови.

*Обратная транскрипция.* Обратная транскрипция по участкам генов core/E1 и NS5 ВГС проводится с рэндом гексамерами в объеме 20 мкл по следующей прописи: смесь №1: рэндом гексамеры – 100 пикомоль, исследуемый образец – 10 мкл. Добавить исследуемую РНК ВГС к праймеру, осторожно перемешать, поместить в термостат при температуре 65°C и прогреть пробу в течение 5 минут, охладить до 25°C. Приготовить смесь №2: 5x RT-буфер, обратная транскриптаза - 40 U, смесь трифосфатов - 1 mM, ингибитор РНКаз - 20 U, бидистиллированная вода - 7,7 мкл. Осторожно перемешать и центрифугировать смеси №1 и 2, поставить в амплификатор при 25°C на 10 минут, затем при 37°C в течение 60 минут, поместить на лед.

*Амплификация по участку гена core/E1 ВГС.*

Для проведения гнездовой ПЦР используются пары праймеров, специфичные для участка гена, кодирующего core/E1 участок генома ВГС:

для проведения 1 раунда ПЦР

fw 290: 5'-TGCCTGATAGGGTGCTTGCGAG, поз.220-241;

rw 1321:5'-ACCAGTTCATCATCATATCCCATGCCAT поз. 1292-1265

для проведения 2 раунда ПЦР

fw 480:5'-CGCGCGACTAGGAAGACTTC, поз. 563-582

rw 1321:5'-ACCAGTTCATCATCATATCCCATGCCAT поз. 1292-1265

В состав реакционной смеси (25 мкл), необходимой для исследования одного образца ДНК, входят следующие компоненты:

10x буфер для полимеразы, 25 mM MgCl<sub>2</sub> в конечной концентрации 1,25 mM, 10 mM трифосфатов в конечной концентрации 0,2 mM, праймеры 290 и 1321 в концентрации 0,25 пикомоль на одну реакцию, деионизованная

вода 15,3 мкл, Таq-полимераза 0,04 U. В качестве отрицательного контроля используется деионизованная вода.

Амплификация проводится в следующем режиме: 95°C – 5 мин; 95°C – 30 сек, 55°C – 30с, 72°C – 1 мин (35 повторов); 72°C – 5 минут.

Продукт первой ПЦР разводят в 100 раз и используют во втором раунде: MgCl<sub>2</sub> – 1,0 mM, смесь трифосфатов – 0,2 mM, праймеры 0,5 пикомоль на одну реакцию (480 и 1321), Таq-полимераза – 0.04 U, ДНК – 5,0 мкл. Режим амплификации: 95°C – 5 мин; 95°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 60 с (35 повторов); 72°C – 5 мин. Размер аплифицированного продукта составляет 729 п.н. (рис. 1).

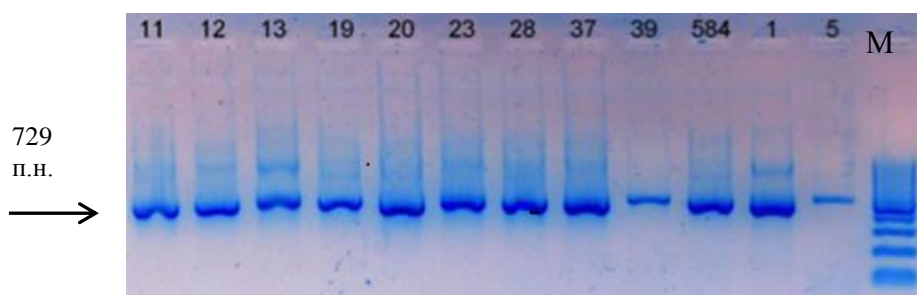


Рисунок -1 Результаты электрофоретической детекции core/E1 участка генома ВГС (11,12,13,19, 20, 23, 28, 37, 39, 584, 1, 5 – исследуемые образцы, М – маркер молекулярного веса).

#### *Амплификация по участку гена NS5 ВГС.*

Для выявления фрагмента генома ВГС NS5 используется кДНК, полученная после обратной транскрипции, и пары праймеров:

Fw: 242 – 5'-TTCCTGGTCATAGCCTCCGTGAA-3' (8281-8305)

Rw: 243- 5'-TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGA-3' (8676-8654).

Размер амплифицированного продукта составляет 395 п.н.

Состав ПЦР смеси: MgCl<sub>2</sub> – 2,5 mM, смесь трифосфатов – 0,5 mM, праймеры по 0,3 mM, 10xПЦР буфер – 2,5 мкл, Таq-полимераза –1 U, кДНК – 3 мкл, деионизованная вода -17 мкл. Режим амплификации: 95°C – 5 мин; 95°C – 15 с, 45°C – 30с, 72°C – 1 мин (35 повторов); 72°C – 5 мин. Размер про-

дуктов амплификации определяют с помощью маркера молекулярного веса ДНК 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н. (рис. 2).

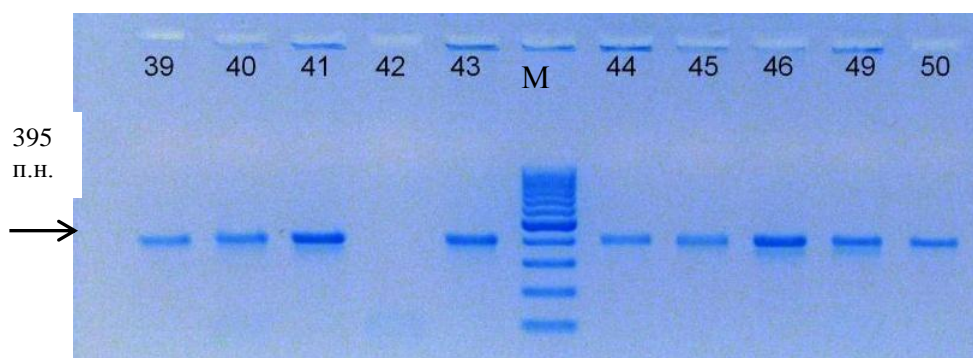


Рисунок 2 – Результаты электрофоретической детекции NS5 участка генома ВГС (39,40,41,42, 43, 44, 56, 46, 49, 50 – исследуемые образцы, М – маркер молекулярного веса).

#### *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 и обратный праймеры (10 пикомоль) к core/E1 участку генома

ВГС:

fw 480:5'-CGCGCGACTAGGAAGACTTC, поз. 563-582

rw1321:5'-ACCAGTTCATCATCATATCCCATGCCAT поз. 1292-1265;

- прямой и обратный праймеры (10 пикомоль) к NS5 участку генома

ВГС

Fw: 242 – 5'-TTCCTGGTCATAGCCTCCGTGAA-3'(8281-8305)

Rw: 243- 5'-TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGA-3' (8676-

8654);

- 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 подгенотипа ВГС и его родственных связей.*

Выполнить биоинформационный анализ результатов электрофореза с помощью стандартного программного обеспечения. Филогенетическое дерево строится для определения подгенотипа вируса и его филогенетических связей UPGMA методом с использованием Maximum Likelihood модели. Для определения подгенотипа ВГС используются референсные нуклеотидные последовательности разных подгенотипов ВГС, полученных из Международной базы данных GenBank (рис.3).



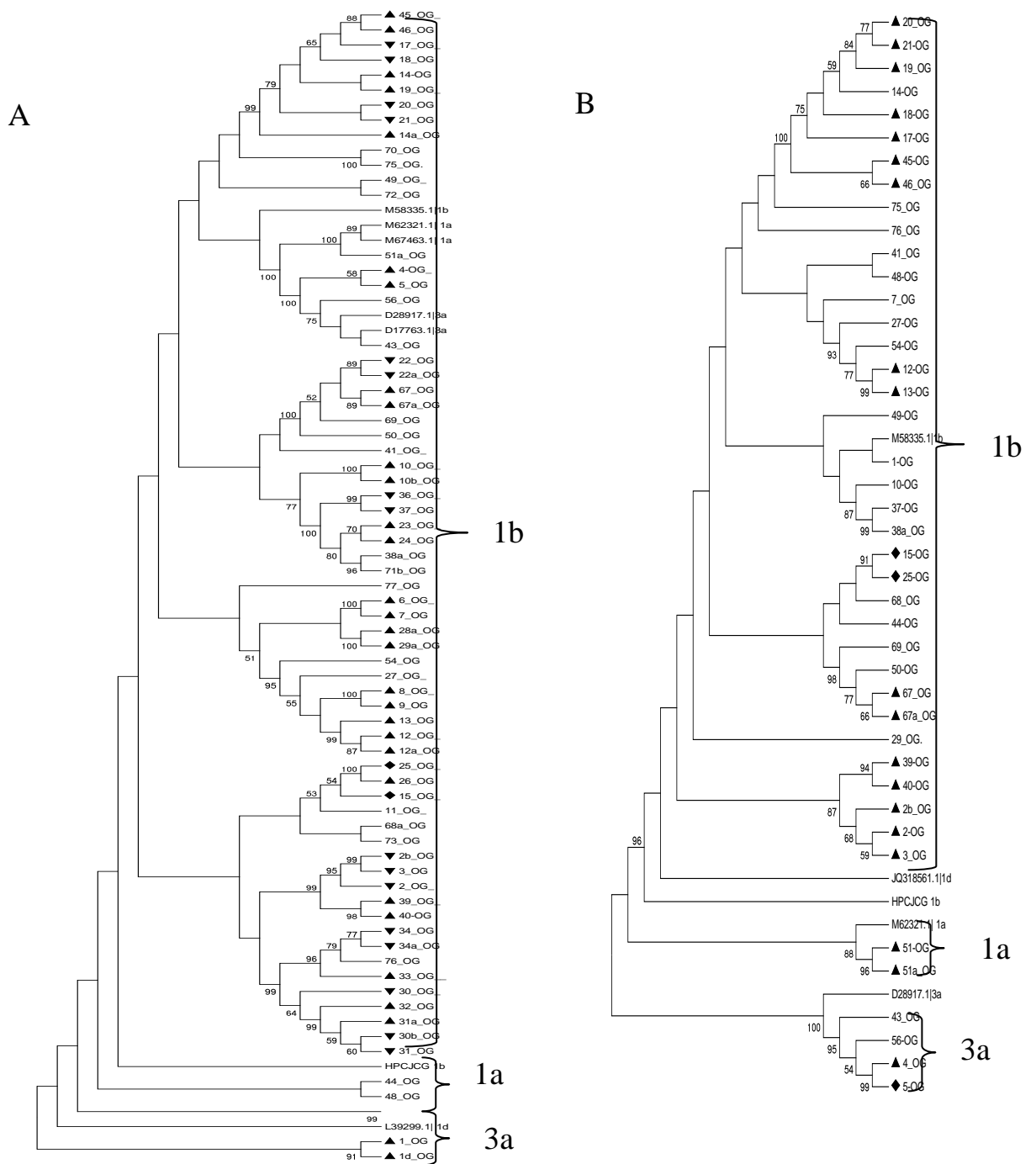


Рисунок 3 - Филогенетический анализ образцов ВГС по генам core/E1 (A) и NS5 (B)

*Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их 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
Нет специфического ампликона в исследуемой пробе несмотря на определяемую вирусную нагрузку	Вирусная нагрузка ниже 3000 копий РНК/мл