

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



Д.Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный № 114-1015

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *MDR1* У
ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАССТРОЙСТВАМИ
ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр психического здоровья»,

Государственное научное учреждение «Институт биоорганической
химии»

АВТОРЫ:

д.м.н. Докукина Т.В., к.х.н. Гилеп А.А., к.м.н. Голубева Т.С., Махров
М.В., Гайдукевич И.В., Марчук С.А., Шермет Е.А., Пинчук А.С.,
Роменский А.В., к.м.н. Жаранков К.С.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с шизофренией, шизотипическими или бредовыми расстройствами. Определение генетического полиморфизма *MDR1* позволяет индивидуализировать подход к назначению антипсихотических лекарственных средств-субстратов гликопротеина (галоперидол, хлорпромазин, зуклопентиксол, трифлуоперазин, флупентиксол, флуфеназин, рисперидон, клозапин, оланзапин, кветиапин) и повысить эффективность лечения.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим шизофренией, шизотипическими или бредовыми расстройствами.

ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Шизофрения, шизотипические или бредовые расстройства (рубрика F2, согласно МКБ-10).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И МАТЕРИАЛОВ

Перечень необходимого оборудования и реактивов представлен в таблицах 1-5.

Таблица 1. Оборудование, материалы и реактивы для выделения ДНК

Наименование	Количество
Ламинарный бокс	1
Настольная микроцентрифуга	1
Вортекс	1
Комплект автоматических дозаторов переменного объема (20-200 мкл; 200-1000 мкл)	1
Холодильник с морозильной камерой	1
Настольный термостат для пробирок типа «Эппендорф» (1,5 мл)	1
Штативы для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл	2
Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл	количество образцов × 2
Одноразовые наконечники для пипеток с аэрозольным фильтром	
Одноразовые медицинские перчатки без талька	
Емкость для сбора биологических отходов	1
Набор для выделения ДНК из клеток буккального эпителия или из слюны с использованием мини-спин колонок.	1

Таблица 2. Оборудование, материалы для проведения ПЦР и рестрикции

Наименование оборудования	Количество
Амплификатор с нагревающейся крышкой	1
Миницентрифуга	1
Вортекс	1
Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5-10 мкл; 2-20 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл)	1
Стерильный ламинарный бокс	1
Холодильник с морозильной камерой	1
Штативы для пластиковых пробирок (1,5мл и 0,2 мл) и стрипов	2
Одноразовые резиновые хирургические перчатки без талька	
Одноразовые полипропиленовые микропробирки (микропробирки в стрипах, 48/96-ячеечные микропланшеты) с максимальным объемом 0,2 мл	
Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток объемом 0,5-10, 10-200 мкл	
Полипропиленовые пробирки вместимостью 0,5 мл и 1,5 мл с закрывающимися крышками	
Контейнер для сброса наконечников и использованных пробирок	1
Твердотельный термостат типа «Eppendorf» для полипропиленовых пробирок вместимостью 0,2мл с закрывающимися крышками, настроенный на температуру (25-100) ⁰ С	1

Таблица 3. Реактивы для проведения ПЦР и рестрикции

Наименование реактива	Назначение
Вода milli-Q	
10 кратный буфер для PCR	Смесь реактивов для создания оптимальных условий для работы Taq ДНК-полимеразы
25 mM MgCl ₂	Источник Mg ²⁺ ионов для работы Taq ДНК-полимеразы
Смесь (дезоксирибонуклеотидтрифосфатов) (концентрация каждого dNTP 2,5 mM)	dNTP Мономер для синтеза ДНК
Олигонуклеотидные праймеры	«Затравка» для синтеза новой цепочки ДНК
Taq ДНК-полимераза (5ед/мкл)	Фермент, осуществляющий синтез ДНК
Образец геномной ДНК	Матрица для синтеза ДНК
10 кратный буфер для рестриктазы	Смесь реактивов для создания оптимальных условий для работы рестриктаз
Рестриктаза MboI	Эндонуклеазы, осуществляющие расщепление цепочки ДНК в определенных местах.

Таблица 4. Оборудование для электрофореза

Наименование оборудования	Количество
рН-метр	1
Печь СВЧ	1
Источник питания с постоянным током	1
Камера для горизонтального электрофореза	1
Форма для заливки геля	1
Набор пластиковых гребенок	1
Посуда для приготовления агарозного геля и буферов	
Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5-10 мкл; 2-20 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл)	1
Система гель-документации	1

Таблица 5. Реактивы для электрофореза

Наименование реактива	Назначение
Вода milli-Q	
Агароза	компонент агарозного геля
Трис-основание	компонент ТАЕ буфера
Ледяная уксусная кислота	компонент ТАЕ буфера
ЭДТА	компонент ТАЕ буфера, компонент буфера для внесения образца
Водный раствор NaOH	компонент ТАЕ буфера
Глицерин	компонент буфера для внесения образца
Бромфеноловый синий	компонент буфера для внесения образца
Маркер молекулярного веса	определение размера фрагментов ДНК

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

Приготовление растворов:

1. 10x ПЦР-буфер: 600мМ Tris-Cl, 170мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween-20.
2. 50x ТАЕ буфер: 242г Tris base, 50 мл ледяной уксусной кислоты, 100мл 0,5М ЭДТА (рН 8.0), вода milli-Q.
3. 1x ТАЕ буфер: 20 мл 50xТАЕ буфера, довести до 1 л водой milli-Q.
4. 5x буфер для нанесения проб: 50% глицерин, 250мМ ЭДТА (рН 8.0), 0.01% бромфеноловый синий.

Определение генетического полиморфизма С3435Т гена *MDR1* включает в себя следующие этапы:

- I. Выделение геномной ДНК из биологического материала (слюны).
- II. Проведение ПЦР (полимеразной цепной реакции)
- III. Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов ДНК.
- IV. Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов.
- V. Интерпретация результатов генетического тестирования.

I. Выделение геномной ДНК из слюны

Геномную ДНК выделяют из слюны. Метод выделения ДНК основан на обратимом связывании нуклеиновой кислоты (ДНК) с поверхностью неорганического сорбента (фильтры на основе боросиликатного стекла) в присутствии хаотропного агента (гуанидин тиоционата).

За 30 минут до работы необходимо достать лизисный буфер из холодильника.

Непосредственно перед началом работы необходимо поместить буфер для элюции в термостат на 70°C.

I. Забор слюны

Образец слюны забирать в специальные пробирки согласно рекомендациям производителя.

II. Лизис клеток и связывание ДНК с сорбентом

1. Поместить 450 мкл слюны в пробирку типа эппендорф (1,5 мл).
2. Добавить 500 мкл лизисного буфера.
3. В течение 7-10 минут встряхивать на шейкере при комнатной температуре.
4. Отобрать пипеткой 900 мкл раствора и нанести его на мини-спин колонку.
5. Центрифугировать 1 минуту при 12 тыс. об./мин.
6. Удалить субнатант.

III. Промывка колонки

7. Нанести на колонку 500 мкл лизисного буфера.
8. Центрифугировать 1 минуту при 12 тыс. об./мин.
9. Удалить субнатант.
10. Нанести на колонку 500 мкл промывочного раствора 1.
11. Центрифугировать 1 минуту при 12 тыс. об./мин.
12. Удалить субнатант.
13. Нанести на колонку 500 мкл промывочного раствора 2.
14. Центрифугировать 1 минуту при 12 тыс. об./мин.
15. Удалить субнатант.
16. Центрифугировать колонки с пустыми приемниками 1 минуту при 12 тыс. об./мин.

IV. Элюция ДНК

17. Перенести колонки в новые пробирки.
18. Нанести на фильтр 100 мкл буфера для элюции (предварительно прогретого до 70°C), выждать 5 минут.
19. Центрифугировать 1 минуту при 12 тыс. об./мин.
20. Нанести на фильтр 100 мкл буфера для элюции (предварительно прогретого до 55°C)

21. Центрифугировать 1 минуту при 12 тыс. об./мин.
 22. Концентрацию ДНК в образце и степень ее очистки измерить при помощи спектрофотометра. Для постановки ПЦР рекомендуется использовать образцы ДНК с концентрацией не более 100 нг/мкл.

Полученные образцы ДНК необходимо хранить при температуре 4°C.

Для выделения ДНК из слюны можно использовать любой другой коммерческий набор для выделения ДНК из клеток буккального эпителия или из слюны с использованием мини-спин колонок, согласно инструкции производителя.

II. Проведение ПЦР для наработки целевого фрагмента гена *MDR1*, содержащего однонуклеотидную замену С3435Т (rs1045642)

Последовательность олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих область гена *MDR1*, содержащего однонуклеотидную замену С3435Т (rs1045642), представлена в таблице 1.

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидных праймеров для С3435Т

Название праймера	Последовательность	Размер фрагмента, п.н.
MDR1_F	GCTGGTCCTGAAGTTGATCTGTGAAC	496
MDR1_R	AAATGTTGCTCTCTCCTAACCTGAAG	

1. В каждую пробирку (0,2 мкл) добавить 2 мкл ДНК.
2. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 2 в количестве, соответствующем числу анализируемых образцов. Конечный объем реакционной смеси в пробирке - 25 мкл.

Таблица 2. Состав смеси для амплификации для С3435Т

Компонент	Конечная концентрация в реакционной смеси
H ₂ O (milli-Q)	-
x10 буфер для амплификации	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTPs (Thermo)	200мкМ
MDR1_f	0,4мкМ
MDR1_r	0,4мкМ
Taq ДНК-полимераза	1ед
DNA	60нг

3. Разлить смесь для амплификации в ПЦР-пробирки по 23 мкл.
4. Промаркировать ПЦР-пробирки
5. Поместить пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой. Температурный режим амплификации задать согласно таблице 3.

Таблица 3. Температурный режим амплификации для С3435Т

Температура	Время	Количество циклов
95°	5 мин	1
95°	30 сек	40
57°	30 сек	
72°	30 сек	
72°	5 мин	1
10°	∞	

III. Проведение рестрикции амплифицированных фрагментов ДНК

1. Для проведения рестриционного анализа для С3435Т приготовить рестриционную смесь согласно таблице 4. Общий объем рестриционной смеси рассчитать из того, что в каждую пробирку с продуктами амплификации необходимо добавить 5 мкл рестриционной смеси.

Таблица 4. Состав рестриционной смеси С3435Т

Компонент	Объем компонента на одну реакцию, мкл	Конечная концентрация в реакционной смеси
H ₂ O (milli-Q)	1,5	-
10x CutSmart (NEB)	3	1x
MboI (NEB)	0,5	5 ед.
Конечный объем	5	-

2. К продуктам амплификации (25 мкл) добавить 5 мкл рестриционной смеси.
3. Рестрицию проводить при температуре 37°С в течение 1 часа.

IV. Визуализация продуктов рестрикции и интерпретация результатов

Разделение продуктов рестрикции проводить методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Для приготовления геля смешать 100 мл 1x ТАЕ, 2 г агарозы, 5 мкл бромистого этидия. Нагреть смесь в микроволновой печи до полного растворения агарозы, остудить до комнатной температуры, залить форму для геля и вставить гребенки для формирования лунок.

После застывания геля перенести его в камеру для электрофореза, содержащую 1x TAE. Смешать продукты рестрикции с 5 мкл буфера для внесения образцов и внести по 25 мкл полученной смеси в гель. В первую лунку каждого ряда внести 3 мкл стандарта SM0241 (Thermo). Электрофорез проводить в течение 60 минут при напряжении 120 V.

При разделении продуктов рестрикции фрагмента гена *MDR1*, содержащего мутацию С3435Т могут образовываться следующие фрагменты:

СС	236+187+73 п.н.
СТ	423+236+187+73 п.н.
ТТ	423+73 п.н.

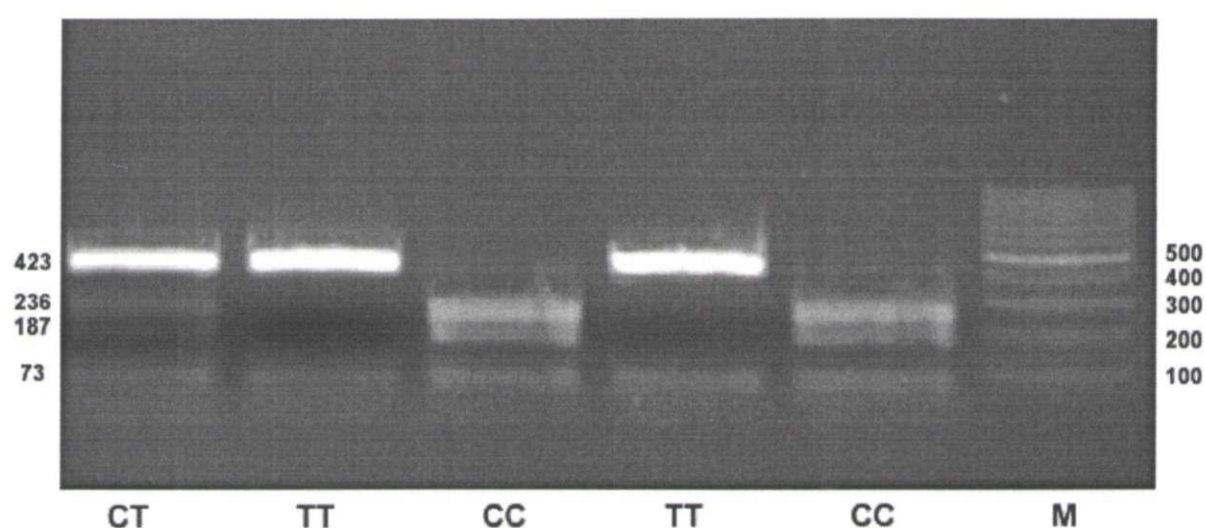


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции С3435Т: справа указаны размеры маркерной ДНК (п.н.), снизу - генотипы, слева - размеры фрагментов рестрикции (п.н.).

V. Интерпретация результатов генетического тестирования

Однонуклеотидная С3435Т располагается в 26 экзоне гена *MDR1* и является синонимичной заменой, т.е. не приводит к аминокислотной замене Ile в положении 1145. Наличие замены С на Т в данном положении ассоциируют с пониженной экспрессией *MDR1* в клеточных мембранах, что является преимущественным признаком в случае лечения ряда заболеваний, так как предполагает более вероятное проникновение лекарственного препарата через клеточные мембраны и оказание его терапевтического эффекта.

Алгоритм интерпретации результатов генетического тестирования

1. При выявлении генотипа СС и СТ рекомендуется назначать антипсихотические лекарственные средства, не являющиеся субстратами Р-гликопротеина или коррекция в сторону повышения суточной дозы лекарственного средства, субстрата гликопротеина Р.
2. При выявлении генотипа СС предпочтительными могут быть немедикаментозные методы лечения (электросудорожная терапия, транскраниальная магнитная стимуляция).
3. При выявлении генотипа ТТ возможно назначение антипсихотических лекарственных средств, являющихся субстратами Р-гликопротеина.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Перечень представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Возможные ошибки и затруднения при применении молекулярно-генетических методов и пути их устранения.

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложно-положительные результаты	1. Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом	Соблюдение принципов зонирования лаборатории для молекулярно-генетических исследований. Использование спец-одежды (стерильные перчатки, халат, бахилы, шапочка). Использование стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов. Использование отрицательных (не содержащих ДНК) контрольных образцов в каждой серии исследований. Проведение исследования в повторе.
	2. Снижение или полная утрата активности используемых рестриктаз	Использование положительных (с известной последовательностью ДНК) контрольных образцов, лучше гетерозигот, в каждой серии