

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«26» 03 20 20 г.

Регистрационный №153-1219



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАРИАНТА
ГЕНА ЧЕЛОВЕКА СУР2С19*2
инструкция по применению

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

АВТОРЫ: чл.-кор. НАН Беларуси, д-р мед. наук, профессор Титов Л.П.,
канд. биол. наук Янович О.О.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения варианта гена человека CYP2C19*2 цитохрома P450 методом ПЦР в режиме реального времени (модификация FRET), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение *H. pylori* – ассоциированного гастрита и язвы двенадцатиперстной кишки.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-гастроэнтерологов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарах и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания.

1. Показания к применению

Гастрит и дуоденит (МКБ10 - K29); язва двенадцатиперстной кишки (K26).

2. Противопоказания к применению: отсутствуют.

3. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения

Таблица 1 - Изделия медицинской техники для проведения молекулярно-генетического анализа

<i>Экстракция ДНК</i>	
ПЦР-бокс	
Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (10000-15000xg)	
Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 мл и 0,5 мл (диапазон рабочих температур +25-+99°C);	
Микроцентрифуга-вортекс	
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл)	
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4°C	
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18°C	
Бактерицидная УФ-лампа	
<i>Проведение FRET-реакции</i>	
ПЦР-бокс	
Термоциклер для проведения ПЦР в режиме реального времени	
Микроцентрифуга-вортекс	

Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4°C
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18°C
Бактерицидная УФ-лампа

Таблица 2 - Реактивы для проведения FRET-реакции

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
Набор реагентов для выделения ДНК из крови
<i>Проведение FRET-реакции</i>
10x буфер для Taq-полимеразы
Taq-полимераза 5 ед/мкл
Хлорид магния 50 мМ
Смесь дНТФ 25 мМ
Олигонуклеотидные праймеры 10 пМ
Флуоресцентно-меченые зонды 10 пМ
Вода стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз

Необходимы следующие изделия медицинского назначения: пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (0,5 мл и 1,5 мл); наконечники полимерные с фильтром объемом 10, 200, 1000 мкл; халаты, резиновые перчатки, штативы для пробирок.

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-биологических исследований.

4. Технология осуществления метода

Материалом для исследования является цельная периферическая кровь. Возможно использование других биологических жидкостей и тканей, в т.ч. биоптатов слизистой оболочки желудка.

1) Взятие и транспортировка биологического материала.

Взятие цельной периферической крови проводится в пробирку с 3% раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной

периферической кровью несколько раз переворачивают для равномерного перемешивания с ЭДТА. Доставка в лабораторию проводится в течении 2 часов при температуре 20-25°C, в течении 12 часов при температуре 2-8°C.

Взятие биоптатов слизистой оболочки желудка осуществляют во время проведения фиброгастроуденоскопии из антрального отдела желудка. Биопсийный материал помещают в стерильные пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 100 мкл стерильного физиологического раствора хлорида натрия, маркируют и доставляют в лабораторию на холоду в течение 1 часа. При необходимости пробы могут храниться при -20°C в течение недели.

2) Экстракция ДНК из биологического материала.

Выделение тотальной ДНК проводят с использованием коммерческого набора, предназначенного для выделения ДНК из соответствующего биологического материала. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°C не более 1 года. Не допускается повторное размораживание-оттаивание образцов.

3) Определение точечной мутации в гене CYP2C19.

Метод определения точечных мутаций FRET включает амплификацию фрагмента гена человека CYP2C19 с одновременным определением продукта в реакции гибридизации и анализом кривых плавления с использованием ПЦР в режиме реального времени.

Последовательность праймеров и программа амплификации приведены в таблицах 1 и 2, соответственно.

Таблица 1 – Олигонуклеотидная последовательность праймеров выявления точечной мутации в гене CYP19C2

Название праймера	Последовательность, 5' - 3'
Прямой праймер	AATTACAACCAGAGCTTGGC
Обратный праймер	TATCACTTTCCATAAAAAGCAAG
Зонд 1	Cy5-TGATTATTTCCCAGGAACCC-Phos
Зонд 2	CTCTTAGATATGCAATAATTTCCCACATC-FAM

Таблица 2 – Условия амплификации с целью выявления точечной мутации в гене CYP19C2

Шаг	Температура	Время
Денатурация 35 циклов	95°C	30 сек.
	95°C	10 сек.
	48°C	10 сек.
Инактивирование Плавление	72°C	14 сек.
	95°C	15 сек.
	от 40°C до 90°C шаг 1°C	

Анализ полученных данных проводят по кривым плавления продуктов ПЦР реакции (рис.1).

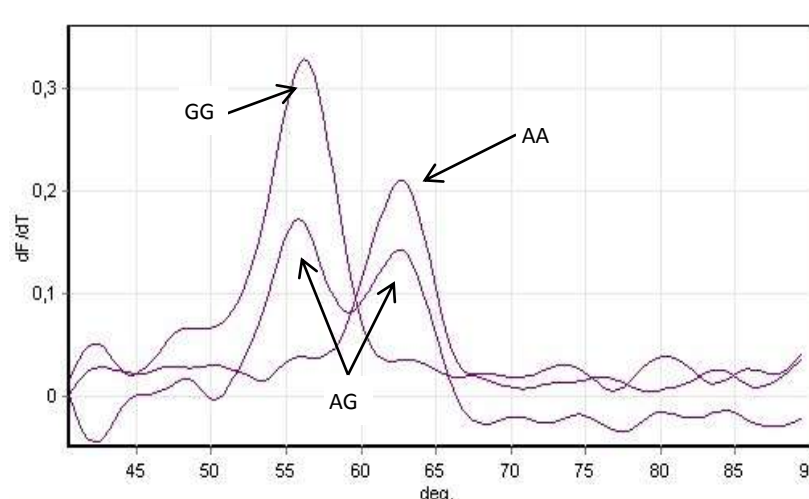


Рисунок 1 - Анализ кривых плавления для определения наличия мутаций в гене CYP2C19

Гомозиготные образцы GG (дикий тип) образуют пик плавления при температуре 56°C, гомозиготы AA (мутантный тип) при температуре – 62°C. Для гетерозиготных образцов характерно наличие обоих пиков.

4) Интерпретация результатов.

При выявлении гомозиготы GG – пациент с быстрым типом метаболизма ингибиторов протонной помпы; гетерозиготы AG - пациент с промежуточным метаболизмом ингибиторов протонной помпы; гомозиготы AA - пациент с медленным типом метаболизма ингибиторов протонной помпы.

5. Заключение

Недостаточная эффективность эрадикационной терапии *H. pylori* может быть вызвана различными причинами, в том числе и генетически обусловленной активностью метаболизма ингибиторов протонной помпы. Основным ферментом, участвующим в метаболизме ингибиторов протонной помпы, является CYP2C19.

В зависимости от наличия разных аллелей изофермента CYP2C19 выделяют несколько фенотипов пациентов: с быстрым метаболизмом ингибиторов протонной помпы - носители диких аллелей (GG); с промежуточным метаболизмом - наличие одного вариантного аллеля (AG); у носителей двух вариантных аллелей (AA) скорость метаболизма ингибиторов протонной помпы значительно снижена.

6. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Использование метода ПЦР подразумевает строгое следование всем правилам организации и проведения исследований в ПЦР-лаборатории.

Возможны следующие ошибки:

отсутствие кривой флуоресценции в пробе положительного контроля или ее наличие в пробе отрицательного контроля свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

отсутствие кривой флуоресценции в препарате положительного контроля указывает на возможную деградацию ДНК, внесение в реакционную смесь ингибиторов реакции. При проведении исследований необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников на всех стадиях постановки во избежание внесения ингибиторов реакции.

Наличие кривой флуоресценции в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации проб.

Сотрудники, проводящие исследования, должны соблюдать методические указания и санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории.