

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Метод определения состояния клеточной сенесценции
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Воропаев Е.В., Зяцьков А.А., Осипкина О.В., Галиновская Н.В.,
Баранов О.Ю., Иванцов О.А., Переволоцкая Т.В.

Гомель, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
27.11.2015

Регистрационный № 107-1015

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНОЙ СЕНЕСЦЕНЦИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Е.В. Воропаев, А.А. Зяцьков, О.В. Осипкина, Н.В. Галиновская, О.Ю. Баранов, О.А. Иванцов, Т.В. Переволоцкая

Гомель 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения состояния клеточной сенесценции, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на выявление групп риска возраст-ассоциированных заболеваний для медицинского наблюдения и оценки при подозрении на заболевание или патологическое состояние (код МКБ-10 — Z03). Метод основан на применении количественного анализа митохондриальной ДНК (мтДНК) как генетического маркера сенесценции.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-неврологов, врачей-кардиологов, врачей-онкологов, врачей-гериатров.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Для определения количества ядерных ДНК (ядНК) и мтДНК используется метод ПЦР-РВ (полимеразной цепной реакции в реальном времени). В таблице 1 приведен перечень оборудования, необходимого для количественного определения ядНК и мтДНК, включающего стадии выделения ДНК и амплификации.

Таблица 1 — Набор оборудования для молекулярно-генетического анализа

Наименование оборудования и основные характеристики	Кол-во
<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>	
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, с диапазоном рабочих температур от 0 до +25°C	1
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур -10 – +99°C)	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Насос с колбой-ловушкой	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл)	1
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4°C	1
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от -16 до -18°C)	1
УФ-стерилизатор, или его аналог	1
<i>ПЦР-реакция</i>	
Амплификатор (термоциклер) с оптической системой, предназначенный для проведения ПЦР и детекции в режиме «реального времени»	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур -10 – +99°C)	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл)	1
Магнит для выделения и очистки нуклеиновых кислот	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4°C	1
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от -16 до -18°C)	1

Также необходимы следующие расходные материалы: ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера); микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл; наконечники с фильтром объемом 10; 20; 200; 1000 мкл; наконечники без фильтра; халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

Перечень набора основных реагентов для работы напрямую связан с выбором оригинальных методов анализа и приготовления собственных реакционных смесей или использования коммерческих наборов.

В таблице 2 приведен список основных реагентов для проведения анализа методом ПЦР-РВ. Качество используемых реагентов, включая воду и солевые растворы, должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для молекулярно-генетических исследований.

Таблица 2 — Список реагентов, необходимых для молекулярно-генетических исследований

Этап исследования	Реагенты
Пробоподготовка	ЭДТА
	Этанол
Выделение ДНК Очистка продуктов ПЦР (ампликонов)	Цетилтриметилбромид аммония
	Трисгидроксиметиламинометан
	Хлорид натрия
	Изопропиловый спирт
	Амиловый спирт
	Этанол
	Хлороформ
	Фенол
	ЭДТА
	Ацетат натрия
ПЦР	Трисгидроксиметиламинометан
	Соляная кислота
	Хлорид магния
	Хлорид калия
	дНТФ
	Олигонуклеотиды (праймеры)
Термостабильная ДНК-полимераза	

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Количественный анализ мтДНК может быть использован в качестве дополнительного лабораторного критерия, позволяющего оценивать сенесценцию (R54 старость по МКБ-10) и прогнозировать биологический возраст.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Забор материала и выделение ДНК

В качестве материала для выделения ДНК с целью определения количества мтДНК используется цельная кровь пациентов.

Для предотвращения свертывания кровь для анализа объемом 1000 мкл поместить в центрифужную пробирку 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5М ЭДТА. Для выделения ДНК предпочтительно использовать готовые коммерческие наборы или в качестве альтернативы, протокол выделения, основанный на изопропанольном осаждении.

В одноразовые пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащие по 100 мкл крови, необходимо внести по 400 мкл экстрагирующего буфера ($t = 65^{\circ}\text{C}$, состав: 2% раствор бромиды цетилтриметиламмония, 0,1 М раствор трис, 1,4 М раствор хлорида натрия, 20 мМ раствор ЭДТА, рН буфера довести HCl до значения 8,0), закрыть крышки, промаркировать пробирки, перемешать содержимое на вортексе, поместить в термостат и инкубировать в течение 30 мин при 65°C .

Затем охладить пробирки до комнатной температуры, добавить к образцам по 500 мкл хлороформа и тщательно перемешать содержимое на вортексе в течение 20 мин. Далее производят центрифугирование при 13000 об./мин ($t = 18-20^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. После этого необходимо пипеткой отобрать 300 мкл супернатанта, перенести в другую пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, добавить 210 мкл охлажденного изопропанола, перемешать содержимое на вортексе и инкубировать при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем производят центрифугирование при 13000 об./мин ($t = 18-20^{\circ}\text{C}$) в течение 15 мин. Полученный осадок ДНК промывают двукратно 1 мл 70% этанола, охлажденного до температуры -10°C .

После промывания содержимое пробирки центрифугируют при 15000 об/мин ($t = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. После промывки этанолом открытые пробирки разместить в твердотельном термостате при температуре 45°C и просушить осадок ДНК в течение 30–40 мин до полного испарения этанола. Высушенный осадок растворить в 50 мкл деионизированной воды при 40°C в течение 30 мин.

Количество полученной ДНК в препарате оценивают с помощью спектрофотометра. Соотношение экстинкций A_{260}/A_{280} должно составлять не менее 1,80.

Растворенную ДНК хранить при $t = -20^{\circ}\text{C}$ для последующего анализа.

2. Количественный ПЦР-РВ анализ

Для количественного анализа мтДНК во всех образцах необходимо выявлять фрагмент гена мтДНК ND1 (NADH-дегидрогеназа) и фрагмент гена яДНК RPPH1 (Ribonuclease P RNA Component H1), который используется в качестве гена-нормализатора. В данной инструкции применен метод ПЦР-РВ по протоколу TaqMan, использующему меченные флуоресцентными метками олигонуклеотидные пробы, комплементарные участку ПЦР-продукта (ампликону).

Для получения стандартизированных результатов ПЦР предпочтительно использовать готовые коммерческие наборы. Смесь реагентов для одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 10×ПЦР-буфер (100 мМ раствор Трис-HCl, рН 9,0, 500 мМ раствор хлорида калия, 25 мМ раствор хлорида магния) — 2,5 мкл, смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ, 10 мМ раствор

каждого) — 0,5 мкл, прямой праймер F (5 мМ раствор) — 1 мкл, обратный праймер R (5 мМ раствор) — 1 мкл, меченая проба (10 мМ раствор) — 1 мкл, Taq ДНК-полимераза (5 ед/мкл) — 0,2 мкл, образец кДНК — 1 мкл. Конечный объем доводится водой до 25 мкл.

Структура праймеров и зондов, используемых для анализа, представлена в таблице 3.

Таблица 3 — Структура праймеров и зондов, используемых для определения количества яДНК и мтДНК

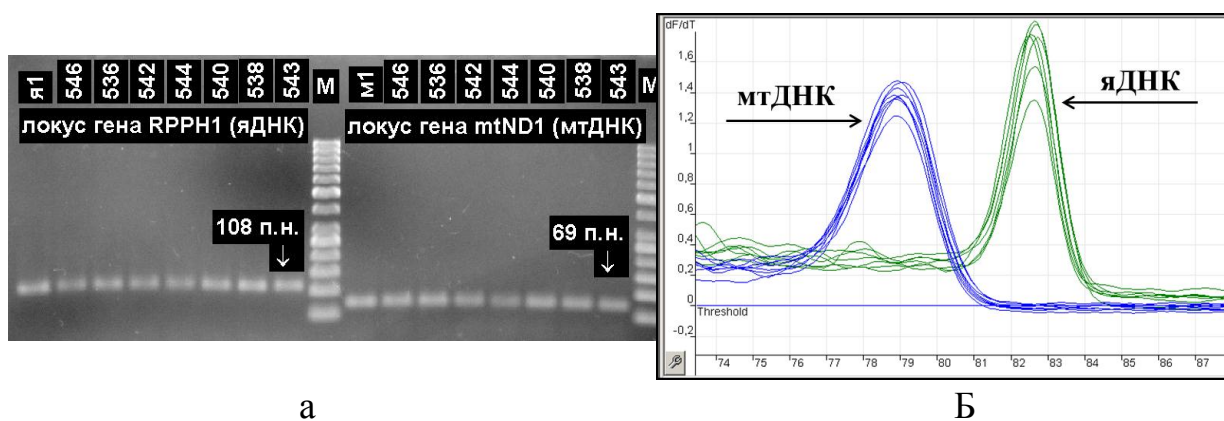
Название локуса	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
Mt-ND1 (мтДНК)	mtND 1-F	CCCTAAAACCCGCCACATCT	69
	mtND 1-R1	GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT	
	mtNDprobe1	HEX-ATCACCCCTCTACATCACCGCCCG-BHQ1	
RPPH1-1 (яДНК)	RPPH1-F	AGCTGAGTGCGTCCTGTCACT	108
	RPPH1-NEW	GAATCACCTCCCCGAAGCT	
	RPPH1probe	HEX-CCGCCTCTGGCCCTAGTCTCAGACC-BHQ1	

Для ПЦР более 1 образца готовят общий раствор (Master mix), в который входят все компоненты смеси (кроме образца ДНК) в количестве, соответствующем числу образцов. Образец вносят индивидуально в каждую пробирку, содержащую алиquotированный (на 1 анализ) Master mix. Программа амплификации исследуемых участков генов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1) представлена в таблице 4.

Таблица 4 — Программа амплификации участков генов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1)

№	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
1	95	10 мин	1
2	95	15 с	40
	60	20 с	
3	4	3 мин	1

Для детекции продуктов амплификации можно использовать метод электрофореза в агарозном геле (рисунок 1а) или анализ кривых плавления (melting curves), основанный на нагревании смеси после окончания ПЦР и непрерывном измерении флуоресценции, которая будет меняться с достижением температуры плавления продукта амплификации (рисунок 1б).



а — электрофорез в агарозном геле; б — анализ кривых плавления

Рисунок 1 — Методы детекции продуктов амплификации

3. Предварительная оценка качественных показателей реакции и достоверности результатов ПЦР-РВ

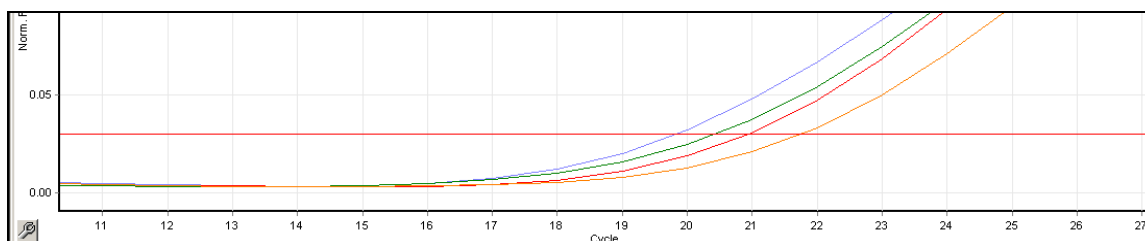
Для качественного контроля ПЦР-РВ в ходе каждой реакции необходимо использовать дополнительные образцы: «отрицательный» и «положительный». Отрицательный образец представляет собой дистиллированную воду и предназначен для выявления артефактов в ходе реакции. Наличие амплификации в данной пробирке указывает на загрязнение реагентов или расходных материалов чужеродной ДНК. Положительный контроль представляет собой пробу, содержащую ДНК, для которой в ходе предварительного изучения была получена достоверная амплификация. Отсутствие реакции в положительном образце указывает на некорректность при составлении ПЦР-смеси или программы амплификации. Качество препаратов ДНК проверяют путем количественного анализа разведений. Для этого готовят 4 варианта разведений: 1:0(1х); 1:1(2х); 1:3(4х); 1:7(8х). В случае низкого качества препарата ДНК (в частности, наличия ингибиторов ПЦР) отмечают изменение угла наклона экспоненциальной части кривой вариантов или выявление несоответствия разницы порогового цикла амплификации (C_t) между первыми и последними вариантами разведений. Некачественные или контаминированные образцы ДНК и реагенты подлежат элиминации из дальнейшей работы.

4. Получение стандартов для количественного анализа

Для количественного расчета мтДНК и яДНК необходимы стандарты с известным числом копий молекул ДНК. В качестве стандарта необходимо использовать очищенные ампликоны исследуемых участков генов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1). Для очистки ампликонов с целью получения стандартов предпочтительны коммерческие наборы, основанные на магнитной сепарации, или их аналоги. После очистки с помощью фотометра определяют концентрацию (нг/мкл) и производят расчет числа копий молекул в полученных препаратах с помощью программ конверсии концентрации в число молекул, широко представленных в свободном доступе на электронных ресурсах.

5. Количественный анализ мтДНК

В начале анализа определяют показатель эффективности ПЦР на экспоненциальной фазе для каждого выявляемого локуса. Для этого предварительно выбирают образец ДНК со значением C_t , равным 15–30 циклам, т. к. сравнивать графики (определять C_t , эффективность реакции) лучше всего на экспоненциальном участке; затем готовят следующие варианты разведения: 1:0; 1:1(2x); 1:3(4x); 1:7(8x) (рисунок 2).



Номер	Цвет	Образец	Название гена	C_t	Концентрация	Разведение
1	Синий	559	RPPH1	19,86	100 нг/мкл	1:0
2	Зеленый	559	RPPH1	20,45	50 нг/мкл	1:1
3	Красный	559	RPPH1	20,96	25 нг/мкл	1:3
4	Оранжевый	559	RPPH1	21,79	12,5 нг/мкл	1:7

Рисунок 2 — Результаты ПЦР-РВ анализа титров образца 559 по гену RPPH1

Для вычисления эффективности реакции используют формулу (1):

$$E = (R_2 / R_1)^{1/(Ct_2 - Ct_1)}, \quad (1)$$

где R — степень разведения образца;

C_t — цикл уровня пороговой флуоресценции (наиболее часто это значение находится в пределах 0,05–0,1 единиц флуоресценции).

При этом разница C_t между разведениями должна быть примерно одинаковой, в ином случае расчет эффективности амплификации для данного локуса будет недостоверным.

В случае эффективной амплификации коэффициент E должен стремиться к 2. Более низкое значение эффективности амплификации ($<1,7$) указывает на необходимость оптимизации ПЦР реакции — изменение программы амплификации, выбор праймеров другого типа, подбор соотношения реагентов ПЦР-смеси. Значение E , превышающее 2, говорит о наличии артефактов и высоком уровне погрешности при выполнении измерений. Исходя из методологических особенностей (весовых и гистологических различий) исследуемых образцов, эффективности выделения ДНК из разных проб и др., препараты образцов могут различаться по количественному содержанию ДНК. Для определения количества копий ДНК исследуемых локусов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1) в каждом образце необходимо использовать следующий алгоритм:

- при ПЦР-РВ для выявления локусов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1) в каждую постановку помимо образцов необходимо включать соответствующий стандарт;
- с помощью стандарта определяют значение Ct для каждого образца;
- рассчитывают число копий локусов мтДНК (mtND1) и яДНК (RPPH1) по формуле (2):

$$N_{\text{образец}} = N_{\text{стандарт}} / (1 + E)^{(Ct_{\text{образец}} - Ct_{\text{стандарт}})}, \quad (2)$$

где $N_{\text{образец}}$ — число копий локусов мтДНК (mtND1) или яДНК (RPPH1);

$N_{\text{стандарт}}$ — число копий локусов стандартов мтДНК (mtND1) или яДНК (RPPH1).

- рассчитывают отношение числа копий локусов мтДНК (mtND1) к яДНК (RPPH1).

Полученный показатель, отношение числа копий локусов мтДНК (mtND1) к яДНК (RPPH1), используется в качестве генетического маркера возраст-ассоциированной патологии.

6. Заключение

Референтный диапазон величин отношения мтДНК/яДНК в возрастной категории 21–40 лет составляет 206,13–277,27; в возрастной категории 41–60 лет — 105,78–161,06 и в возрастной категории 61–80 лет — 84,46–107,79. Если значение отношения мтДНК/яДНК, рассчитанное для обследуемого, ниже соответствующего референтного, то констатируют увеличение риска возраст-ассоциированных заболеваний (Z03.5 «Наблюдение при подозрении на другую болезнь сердечно-сосудистой системы», Z03.4 «Наблюдение при подозрении на инфаркт миокарда», Z03.1 «Наблюдение при подозрении на злокачественную опухоль»), а пациент нуждается в обязательном углубленном обследовании и дополнительном диспансерном наблюдении. Отношение мтДНК/яДНК может быть использовано как дополнительный критерий с целью определения групп риска по возраст-ассоциированным заболеваниям.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Для правильной организации ПЦР-лаборатории и высококачественных молекулярно-генетических исследований необходимо строгое соблюдение правил на всех этапах работы: забор, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Нарушение этих правил является причиной неверной диагностики и интерпретации полученных результатов.

Концентрация и чистота препарата ДНК являются важными факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа. Несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, неисправность оборудования приводит к низкому количественному выходу, деградации полученных препаратов, наличию в них ингибиторов ПЦР. Такие препараты непригодны для проведения высокотехнологичных исследований. Оценка достоверности результатов при

проведении ПЦР в реальном времени основывается на определении интенсивности уровня флюоресцентного сигнала, который в свою очередь связан с детектируемым количеством ДНК и может различаться в разных экспериментах и на разных типах приборов. Таким образом, для получения воспроизводимых результатов не рекомендуется использовать различные методы выделения, амплификаторы, изменять параметры реакционных пробирок и точность разнесения реактивов по пробиркам. Особую опасность представляет собой контаминация (источник ложноположительных результатов) загрязненными реагентами, инструментарием, продуктами ПЦР и перекрестная контаминация от пробы к пробе. Выявить случаи контаминации в отдельных пробах можно при выделении ДНК и постановке реакции в двух или трех параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Параллельно с опытными образцами в каждом эксперименте должны использоваться специальные контроли, позволяющие верифицировать результаты: маркер длин фрагментов ДНК, стандарты и калибраторы для ПЦР-РВ.