Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов

Методические рекомендации
МР 4.2.0075—13

Издание официальное

Москва • 2013

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов

Методические рекомендации
МР 4.2.0075—13

ББК 51.21
П27

П27 **Перечень** маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—24 с.

ISBN 978—5—7508—1246—2

1. Разработаны Федеральным бюджетным учреждением науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Н. В. Зайцева, О. В. Долгих, А. В. Кривцов, Д. Г. Дианова, Д. В. Ланин, Т. С. Лыхина, А. М. Гугович, Р. А. Харахорина); Федеральным бюджетным учреждением науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (А. Г. Богун).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 20 августа 2013 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.21

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 25.10.13

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5

Тираж 200 экз. Заказ 70

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 8(495)952-50-89

© Роспотребнадзор, 2013
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013

Содержание

Список сокращений 4
1 Общие положения 5
2. Область применения 6
3. Основная часть 7
3.1. Введение 7
3.2. Методика генетического тестирования однонуклеотидных полиморфизмов 8
3.3. Требования к помещениям и технике безопасности 11
3.4. Аппаратура, материалы и реактивы 12
3.5. Подготовка материала для исследований 14
3.6. Порядок проведения исследований 16
3.7. Интерпретация результатов 18
4. Библиографические данные 22
Приложение 1. Перечень маркеров генетического полиморфизма для оценки воздействия неблагоприятных техногенных химических факторов 23
Приложение 2. Перечень ДНК-баз для поиска генетического полиморфизма 24

Список сокращений

ТХФ – техногенный химический фактор
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
ACE – ангиотензин-превращающий фермент
CYP1A1 – цитохром P1A1
CYP1A2 – цитохром P1A2
CYP17 A1 – цитохром P17A1
гены PPARA, PPARD, PPARG – гены альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом
CYP2C19 – цитохром P2C19
GSTP1 – глутатион S-трансфераза
MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза
SNP (ОНП) – однонуклеотидный полиморфизм
NOS3 – NO-синтаза
APO-E – аполипопротеин
TNFальфа – фактор некроза опухоли-альфа
CPOX – копропорфириногеноксидаза
VEGF – эндотелиальный фактор роста
IL4 – интерлейкин 4
HLA DR – Human Leukocyte Antygen – человеческий лейкоцитарный антиген 2 класса
p53 – белок, фактор клеточной транскрипции
BRCA1, BRCA2 – гены онкопролиферации

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
20 августа 2013 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов

Методические рекомендации
МР 4.2.0075—13

1. Общие положения

1.1. Методические рекомендации предназначены для ранней диагностики и профилактики формирования генетически опосредованных нарушений здоровья у лиц, проживающих и работающих в условиях воздействия комплекса техногенных химических факторов среды обитания.

1.2. В настоящих рекомендациях использованы результаты изучения генетического полиморфизма, характеризующего нарушение генетически опосредованных адаптационных процессов у детей и работающих, связанных с неблагоприятным воздействием химических факторов среды обитания.

1.3. Реализация углубленных диагностических исследований, направленных на выявление особенностей развития генетических и эпигенетических нарушений в условиях воздействия химических факторов проводится лечебно-профилактическими учреждениями, лицензированными в установленном порядке в системе лицензирования Министерства здравоохранения Российской Федерации в области проведения соот-

ветствующих химико-аналитических, клинико-лабораторных, лечебно-профилактических мероприятий.

1.4. Все исследования осуществляются в строгом соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов.

2. Область применения

2.1. Настоящие методические рекомендации разработаны для проведения гигиенической оценки неблагоприятного воздействия техногенных химических факторов на развитие генетических нарушений у лиц, проживающих и работающих в условиях воздействия комплекса техногенных химических факторов среды обитания. В настоящих методических рекомендациях определен перечень генетических маркеров эффекта, а также методология идентификации генетических нарушений в условиях химической контаминантной нагрузки.

2.2. Методические рекомендации предназначены для научных учреждений Федеральной и территориальной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при проведении санитарно-эпидемиологической экспертизы, расследований, исследований, генетической, токсикологической, гигиенической и иных видов оценок по установлению причинно-следственных связей между факторами среды обитания и здоровьем населения субъектов Федерации. Рекомендации также могут быть использованы лечебно-профилактическими и другими организациями, независимо от организационно-правовой формы и направлений исследований (научная или прикладная форма постановки и решения проблемы), занимающимися вопросами гигиенической оценки развития неинфекционных заболеваний, вопросами предотвращения и снижения неблагоприятных последствий воздействия факторов среды обитания на здоровье человека.

2.3. Методические рекомендации предназначены для проведения гигиенических исследований в условиях воздействия комплекса техногенных химических факторов, обладающих мутагенным и канцерогенным эффектами и влиянием на развитие: полициклические ароматические углеводороды (бенз(а)пирен), алифатические альдегиды (формальдегид), ароматические углеводороды (бензол), хлорорганические соединения (хлороформ), фенолы, тяжелые металлы (свинец, хром, ванадий, марганец). Перечень генетических маркеров эффекта охватывает следующие критические области генетического полиморфизма: гены ферментов системы детоксикации ксенобиотиков; гены, участвующие в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях; гены белков предрасположенности к онкопролиферативным состояниям; гены ак-

тивности состояния компонентов иммунного ответа. Маркеры приоритетных однонуклеотидных полиморфизмов представлены в прилож. 1.

3. Основная часть

3.1. Введение

Здоровье человека постоянно подвергается негативному воздействию химических мутагенов. В связи с этим актуальной проблемой является разработка методов выявления адаптивности отдельного человека и популяции к действию химических мутагенов, связанной с полиморфизмом генов.

Вследствие генетической гетерогенности популяции человека в ней присутствуют индивиды, генетические особенности которых обусловливают повышенную чувствительность к действию мутагенов.

Восприимчивость организма к воздействию техногенных химических факторов в значительной мере зависит от особенностей генетических ассоциаций, определяющих активность ферментов системы детоксикации ксенобиотиков, активность факторов, участвующих в патогенезе техногенных нарушений в органах-мишенях, состояние белков предрасположенности к онкопролиферативным состояниям, активность состояния компонентов иммунного ответа.

При этом особый интерес вызывают вопросы функциональной организации генома и особенностей генетического полиморфизма.

По данным научной литературы, распространенность минорного аллеля в популяции занимает в среднем 10 % по большинству значимых полиморфизмов.

Развитие исследований и методического базиса в этом направлении необходимо для профилактического обеспечения путей защиты и стабилизации генома человека в условиях возрастающего загрязнения окружающей среды.

Необходимость перехода в оценке генома человека от отдельных индивидов к более детальному анализу популяционных структур настоятельно требует исследований по выявлению мутаций, связанных с проявлением изменчивости внутри небольших локальных популяций. Такая изменчивость известна как полиморфизм. Генетический полиморфизм может быть качественным, когда происходят замены нуклеотидов, либо количественным, когда в ДНК варьирует число нуклеотидных повторов различной протяженности. Тот и другой виды генетического полиморфизма встречаются как в смысловых (белок-кодирующих), так и во внегенных последовательностях молекулы ДНК. Данный методический документ разработан для идентификации однонуклеотидных

полиморфизмов (SNP), то есть замены одного нуклеотида другим, характерной для качественного полиморфизма.

Детекция значимых полиморфизмов при воздействии техногенных химических мутагенов: полициклических ароматических углеводородов (бенз(а)пирен), алифатических альдегидов (формальдегид), ароматических углеводородов (бензол), хлорорганических соединений (хлороформ), фенолов, тяжелых металлов (свинец, хром, ванадий, марганец) требует выполнения исследований следующих однонуклеотидных замен:

1. Гены 1-й фазы детоксикации (биотрансформация всех чужеродных веществ) – цитохромы P450 (CYP1, CYP2, CYP17).

2. Гены 2-й фазы детоксикации (нейтрализация или конъюгация чужеродных соединений) – глутатион-S-трансфераза (GST), метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), копропорфириногеноксидаз (CPOX).

3. Гены иммунорегуляции – HLA-комплекс (HLA-DR), гены цитокинов: ген рецептора интерлейкина-4 (IL4R), ген фактора некроза опухоли (TNF альфа).

4. Гены онкопролиферативных состояний – ген p53 (транскрипционный фактор, внутриклеточный онкосупрессор), гены BRCA (рак женской репродуктивной сферы).

5. Соматические, патогенетические гены (участие в развитии нарушений в органах-мишенях) – ген васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGF), ген эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), ген ангиотензин-1 превращающего фермента (ACE), гены рецепторов активации пролиферации пероксисом (гены семейства PPAR).

3.2. Методика генетического тестирования однонуклеотидных полиморфизмов

Для поиска и идентификации ДНК-полиморфизма в настоящее время разработаны и широко применяются различные методы, число которых приближается к ста.

В зависимости от целей исследования, все молекулярно-генетические методы можно подразделить на две группы: методы, направленные на поиск неизвестных мутаций (первичная идентификация), и анализ известных мутаций.

Методы, применяемые для первичной идентификации мутаций, то есть позволяющие скринировать на наличие ДНК-поломок достаточно протяженные фрагменты генов, включают метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК, денатурирующий градиентный гель-электрофорез, метод гетеродуплексного анализа, метод хими-

ческого расщепления некомплементарных сайтов, метод тестирования «неполноценного» белка, метод масс-спектрометрии и метод биочипов.

Выявление мутаций этими методами должно обязательно подтверждаться результатами прямого секвенирования изучаемого ДНК-фрагмента гена. Таким образом, большинство перечисленных методов (за исключением масс-спектрометрии и биочипов) позволяет выявить только подозрительные на наличие точковых и других мутаций участки ДНК, и только метод секвенирования дает полную информацию о типе и характере нуклеотидных изменений. Зачастую первичный поиск нарушений в кодирующих областях гена проводят именно таким образом.

Одним из самых часто используемых молекулярных методов, позволяющих идентифицировать многие уже известные мутации, является ПЦР. Кроме того, этот метод лежит в основе других методов изучения генома.

3.2.1. Проведение полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция проводится в несколько последовательных этапов, для реализации которых широко используются специальные программируемые аппараты – термоциклеры, позволяющие задавать и поддерживать определенный температурный режим реакции. Все компоненты реакции – матричную ДНК, олигопраймеры, смесь дезоксинуклеотидов и термофильную ДНК-полимеразу – добавляют в специальный солевой буфер непосредственно перед помещением пробирки с реакционной смесью в термоциклер.

На первом этапе исследуемая двухнитевая матричная ДНК переводится в однонитевую форму путем её нагревания в течение нескольких минут до температуры 94—98 °С. Дальнейшая схема заключается в чередовании циклов:

- гибридизация или отжиг ДНК с праймерами;
- синтез последовательностей, комплементарных матричной ДНК;
- денатурация образовавшихся двухнитевых структур.

На этапе гибридизации температура реакционной смеси снижается до 50—65 °С. Находящиеся в растворе олигопраймеры гибридизуются с денатурированной (одноцепочечной) геномной ДНК, содержащей комплементарные (соответствующие им) участки.

Повышение температуры до 65—72 °С, оптимальной для работы термофильной Taq ДНК-полимеразы, запускает синтез ДНК в направлении от 5' к 3'-концу геномной ДНК-матрицы. При дальнейшем повышении температуры до 80—90 °С синтез ДНК прекращается, происходит денатурация с освобождением с геномной матрицы уже синтезирован-

ных фрагментов ДНК, которые, в свою очередь, становятся матрицами для синтеза ДНК при последующих циклах амплификации.

Таким образом, в каждом цикле происходит увеличение числа синтезированных копий участка амплификации, причем содержание продуктов амплификации нарастает в геометрической прогрессии.

Регистрация сигнала флюоресценции, возникающего при накоплении продуктов амплификации участков ДНК, проводилась в режиме «реального времени» после стадии отжига праймеров для выбранных генов по каналу VIC для детекции одного из аллельных вариантов генов и по каналу FAM – для альтернативного варианта.

При помощи ПЦР можно идентифицировать многие мутации, а также изучать полиморфные сайты. Подбор олигопраймеров проводят на основании анализа нуклеотидных последовательностей в участках ДНК, фланкирующих ту или иную мутацию.

Подбор праймеров целесообразно проводить согласно следующим критериям:

- отсутствие внутренней вторичной структуры;
- сбалансированный состав и равномерное распределение G/C и A/T пар по всей последовательности;
- отсутствие комплементарности между 3'-концами (из-за существования опасности образования димеров праймеров);
- наличие единой температуры плавления (разброс температур плавления праймеров не более 1 °С от среднего значения);
- отсутствие комплементарности последовательностей праймеров с последовательностями других генов в геноме человека.

Другим вариантом детекции результатов ПЦР является гель-электрофорез продуктов амплификации, при котором продукты реакции наносят на агарозный гель и проводят горизонтальный электрофорез. В дальнейшем гели окрашивают красителем этидием бромидом и визуализируют продукты ПЦР в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 380 нм. Кроме того, продукты амплификации можно идентифицировать путем блот-гибридизации со специфическими ДНК-зондами или другими методами окрашивания.

3.2.2. ПЦР в реальном времени

Используют так называемое резонансное тушение флюоресценции в TaqMan системе, позволяющее контролировать кинетику ПЦР амплификации непосредственно в ходе реакции. Для детекции мутаций используют зонды, несущие на 5'- и 3'-концах соответственно различные флюорофоры (светители) и их «тушители», которые, находясь рядом,

подавляют флюоресценцию. При этом зонды должны быть комплементарны последовательности амплифицируемой ДНК и отличаться лишь одним нуклеотидом, характерным для одного и другого аллеля. Зонд, содержащий на 3'-конце краситель FAM, полностью комплементарен аллелю 1 и при гибридизации дает устойчивый дуплекс. При гибридизации этого зонда с аллелем 2 будет происходить неполное спаривание нуклеотидов и возникает так называемый «мисматч». Соответственно зонд, имеющий метку VIC, полностью комплементарен аллелю 2, но при гибридизации с аллелем 1 не дает устойчивого дуплекса.

Непосредственно перед реакцией в ПЦР-смесь добавляют зонды, которые гибридизуются с комплементарными им последовательностями ДНК. В случае гетерозиготы по исследуемым аллелям гибридизуются оба зонда.

Достраивая комплементарную последовательность ДНК, Taq-полимераза за счет своей экзонуклеазной активности разрушает только устойчивые дуплексы. При этом происходит отщепление соответствующего флюорофора, который переходит в раствор и, не находясь под влиянием «тушителя», дает свой флюоресцентный сигнал. В зависимости от сигнала свечения, можно судить каким аллелем (аллелями) представлен данный образец ДНК. Интенсивность сигнала флюоресценции зависит от числа циклов ПЦР. Размер амплифицируемого фрагмента ДНК обычно не превышает 150 нуклеотидов, что серьезно ограничивает применение этого метода. Вместе с тем прохождение реакции можно контролировать в реальном времени, что является ее главным преимуществом. Для того, чтобы диагностировать наличие мутации, иногда достаточно провести менее 25 циклов амплификации.

Существуют и другие методы детекции мутаций. К ним относятся: денатурирующая жидкостная хроматография высокого разрешения, метод поверхностного плазмонного резонанса, методы ДНК-чипов, метод масс-спектрометрии, ресеквенирование генома.

Методика тестирования генетического полиморфизма методом ПЦР включает три этапа, два из которых позволяют оценить мутации в режиме реального времени, а третий – в случае необходимости детекции и учета продуктов амплификации гель-электрофорезом.

3.3. Требования к помещениям и технике безопасности

3.3.1. При выполнении измерений с использованием детектирующего амплификатора соблюдают меры безопасности, указанные в «Руководстве по правилам эксплуатации прибора», правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019, противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004.

3.3.2. При работе в лаборатории необходимо иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

3.3.3. Необходимо соблюдать правила по технике безопасности и производственной санитарии при работе в лабораториях, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот и рекомендованные при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности.

3.3.4. Помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4. Аппаратура, материалы и реактивы

Перечень оборудования, реактивов и материалов, необходимых для методического обеспечения идентификации ОНП:

3.4.1. Средства измерения:

Весы лабораторные 2 класса (максимальная нагрузка до 200 г, основная погрешность при измерении не более 0,2 мг); используются для взвешивания сухих ингредиентов при подготовке рабочих растворов
Иономер (pH-метр); используется для определения pH буферных растворов

3.4.2. Оборудование:

Программируемый термоциклер (амплификатор)
Источник постоянного тока
Дистиллятор
Бидистиллятор
Аппарат для встряхивания – вортекс
Шкаф сушильный
Центрифуга лабораторная
Термостат ТС-80М-2, диапазон рабочих температур 28—55 °С
Холодильник-морозильная камера (до –25 °С)
Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру 3—5 °С
Центрифуга
Баня водяная с электрическим подогревом
Аппарат для электрофореза ПГ-9, размеры камеры 9 × 13 см
Ультрафиолетовый трансиллюминатор

Автоклав	
Ламинарный шкаф	
Настенные, потолочные или передвижные источники ультрафиолетового света	

3.4.3. Вспомогательные изделия и материалы

Вата медицинская	ГОСТ 5556—81
Микроцентрифужные пробирки-виалы 0,5—1,5 мл	
Колбы мерные 50, 100, 200, 500, 1 000 мл	ГОСТ 12738—77
Лабораторный штатив	ТУ 64-17-07—72
Микродозаторы, 1—20, 20—200, 200—1 000 мкл	
Наконечники для микродозаторов	
Пробирки	ГОСТ 10515—75
Пипетка мерная	ГОСТ 20292—74
Фотопленка «Тасма»	
Фотобачок 350 мл	
Цилиндр мерный 1—25, 1—100, 1—1 000 мл	ГОСТ 1770—74

3.4.4. Реактивы, растворы

Агароза	
Вода бидистиллированная	
Масло вазелиновое, хч	ГОСТ 3161—78
Магния хлорид, хч	ГОСТ 4165—78
Натрия хлорид, хч	ГОСТ 4233—77
Натрия додецилсульфат;	
Спирт этиловый (ректификат)	ГОСТ 18300—87
Спирт изоамиловый	ГОСТ 5830—79
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328—77
Фенол	
Хлороформ	ГОСТ 1248—72
тРНК;	
Трис-(оксиметил)-аминометан	ТУ 6-09-4292—76
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)	ГОСТ 10652—73
Этидий бромистый	
Бромфеноловый синий	
Тритон Х-100	
Протеиназа К	
Соляная кислота, хч	ГОСТ 3118—67
Мертиолят натрия	
Ацетон, хч	
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	

2-меркаптоэтанол
Набор дезоксинуклеотидтрифосфатов
Специфичные праймеры для амплификации ДНК конкретных искомых полиморфизмов
Образцы ДНК конкретных полиморфизмов (в качестве положительных контролей)
Фермент термостабильной ДНК-полимеразы, выделяемый из штамма микроорганизма Thermus aquaticus (Taq-ДНК-полимераза)
Гуанидинтиоционат
Двуокись кремния (SiO_2) с размером частиц 0,5—10 микрон

3.5. Подготовка материала для исследований

3.5.1. Взятие материала для исследования.

Забор образцов необходимо производить только в одноразовые пластиковые микроцентрифужные пробирки или в стеклянные пробирки, предварительно обработанные в течение 1 ч хромовой смесью, тщательно промытые и прокаленные.

3.5.2. Выделение очищенной ДНК методом фенол-хлороформовой экстракции.

3.5.2.1. Подготовка реактивов для лизиса клеток и очистки ДНК-матриц.

Лизирующий буфер.

Делают навески: Трис-(оксиметил)-аминометан – 0,024 г (0,2 м), натрия додецилсульфат – 5,0 г (5 %), натрия гидроокись – 0,0016 г (0,04 м). Доводят дистиллированной водой до 200 мл.

Фенол-хлороформовая смесь.

В герметично закрывающемся мерном цилиндре смешивают: 25 мл фенола (pH 7,0), 24 мл хлороформа, 1 мл изоамилового спирта.

Раствор тРНК.

Делают навеску тРНК = 5 мг, растворяют в 1 мл бидистиллированной воды, хранят при –20 °С.

3.5.2.2. Лизис клеток и выделение очищенной ДНК.

Смешивают с 200 мкл лизирующего буфера 200 мкл исследуемого образца и инкубируют в течение 15—20 мин при 37—42 °С. Экстрагируют ДНК, добавляя в пробирку 400 мкл фенол-хлороформовой смеси, тщательно перемешивают. Центрифугируют при 12 000 об./мин в течение 2—5 мин. Отбирают 200—300 мкл водной фазы. К полученному супернатанту добавляют $^1/_{10}$ объема раствора тРНК (5 мкг/мкл), натрия

ацетат – 3 М – $^1/_{10}$ объема и два объема охлажденного этанола. Выдерживают 15 мин при –70 °С (или 2 ч при –20 °С) и затем центрифугируют при 12 000 об./мин 10 мин. Осадок растворяют в 25 мкл стерильной бидистиллированной воды и используют для проведения ПЦР.

3.5.2.3. Выделение ДНК методом нуклеосорбции.

3.5.2.3.1. Приготовление рабочих растворов.

Лизирующий буфер (ЛБ).

Гуанидинтиоционат (конечная концентрация 6 М) 18 г; дитиотрейтол (0,2 М) 95 мг; ЭДТА (0,5 М) 1 мг – все компоненты растворяют в 30 мл дистиллированной воды.

Раствор для первой отмывки (ОР-1).

Гуанидинтиоционат (4 М) 12 г, дитиотрейтол (0,2 М) 95 мг – растворяют в 30 мл дистиллированной воды.

Раствор для второй отмывки (ОР-2).

Трис-(оксиметил)-аминометан (1 М, pH 7,3) 1 мл; натрия хлорид (5 М) 1 мл; этанол (50 %) 50 мл; дистиллированной воды 50 мл.

Суспензия сорбента (СС).

Готовят 50 %-ю (вес/объем) суспензию силикагеля (SiO_2) в 2-деионизированной воде.

3.5.2.3.2. Методика выделения ДНК.

1) В пробирки объемом 1,5 мл вносят по 900 мкл ЛБ и 40 мкл СС, встряхивают на вортексе в случае немедленного использования или сохраняют до 1 недели.

2) Вносят 50 мкл исследуемого материала, подготовленного как указано выше, немедленно встряхивают на вортексе в течение 5 с, оставляют на 10 мин при комнатной температуре, повторно встряхивают в течение 5 с и центрифугируют в течение 15 с в микроцентрифуге типа «эппендорф» (угловой ротор 12 000 g). Супернатант удаляют в сосуд с 10 М раствором NaOH, не допуская разбавления щелочи ниже 0,3 М. Таким образом достигается нейтрализация ядовитой синильной кислоты – HCN, которую может образовывать ГТЦ при контакте с кислотами.

3) Осадок сорбента отмывают 2 раза в ОБ, затем дважды 70 %-м этанолом, 1 раз ацетоном.

4) После удаления ацетона пробирки с открытыми крышками прогревают в микротермостате при 56 °С в течение 10 мин.

5) К осадку сорбента добавляют 50—75 мкл буферного раствора для электрофореза. Пробирки закрывают крышками, встряхивают на вортексе в течение нескольких секунд, инкубируют 10 мин при 56 °С, повторно встряхивают и центрифугируют 2 мин при 12 000 g. Супернатант содержит ДНК и используется для постановки ПЦР.

Процедура выделения нуклеиновых кислот может быть выполнена с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкциями по применению.

3.6. Порядок проведения исследований

Приготовление реакционной смеси для ПЦР.

В микроцентрифужные пробирки емкостью 0,5 мл последовательно, с помощью автоматической микропипетки, добавляют: 10-кратный буферный раствор [трис-HCl с pH 8,4 – 670 мМ, хлорид магния – 25 мМ, 2-меркаптоэтанол – 100 мМ, сульфат аммония – 166 мМ, бычий сывороточный альбумин (БСА) – 1,7 мг/мл] – 7 мкл; раствор дезоксинуклеотидтрифосфатов (из смеси дАТФ, дТТФ, дЦТФ, дГТФ по 0,2 мМ каждого) – 5 мкл; раствор каждого праймера – по 2 мкл (12—50 пМ); образец (лизат клеток) – 25 мкл. Общий объем реакционной смеси доводят до 48 мкл бидистиллированной водой. Рекомендуется готовить общую смесь реактивов в количестве, соответствующем числу проб, добавляя вышеназванные ингредиенты в указанных пропорциях.

В одну из пробирок (положительный контроль) вместо образца вносят контрольный препарат ДНК – 1 мкл (0,1 нМ), 10х буфер, растворы дезоксинуклеотидтрифосфатов и праймеров – в тех же количествах, что и с образцом. Общий объем реакционной смеси доводят до 48 мкл бидистиллированной водой. При использовании ПЦР для детекции ДНК-матриц в качестве положительного контроля возможно использование лизата клеток. Для отрицательного контроля вместо образца вносят 25 мкл бидистиллированной воды, остальные ингредиенты в тех же количествах. На поверхность реакционной смеси наслаивают по 30 мкл стерильного вазелинового масла.

Пробирки помещают в термоциклер и денатурируют содержимое нагреванием при температуре 94 °С в течение 10 мин. В каждую пробирку добавляют по 2 мкл (1—2,5 ед.) Taq-полимеразы.

Проводят реакцию амплификации. Каждый цикл амплификации включает в себя три температурных режима: денатурацию ДНК (92—94 °С – 1 мин), отжиг праймеров (45—68 °С – 0,5—2 мин), синтез комплементарной цепи (70—72 °С – 1—3 мин).

Регистрация сигнала флюоресценции, возникающего при накоплении продуктов амплификации участков ДНК, проводилась в режиме «реального времени» после стадии отжига праймеров для выбранных генов по каналу VIC для детекции одного из аллельных вариантов генов и по каналу FAM – для альтернативного варианта.

Для проведения ПЦР в режиме «реального времени» могут быть использованы коммерческие тест-наборы с обеспечением реакционной смеси в соответствии с инструкциями по применению тест-систем.

При отсутствии оборудования для детекции продуктов ПЦР в «реальном времени», необходимо после последнего цикла пробы прогреть в течение 10 мин при температуре 72 °С (при необходимости оставить пробы после реакции на ночь, их помещают в холодильник на 4 °С или вводят дополнительный цикл на амплификаторе: 4 °С – 12 ч или более) и провести 3 этап исследований – электрофоретический.

При выполнении гель-электрофореза продукты амплификации наносят на агарозный гель и проводят горизонтальный электрофорез. В дальнейшем гели окрашивают красителем этидием бромидом и визуализируют продукты ПЦР в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм. Кроме того, продукты амплификации можно идентифицировать путем блот-гибридизации со специфическими ДНК-зондами или другими методами окрашивания.

Детекция результатов ПЦР методом гель-электрофореза

1) Подготовка к электрофорезу в агарозном геле.

Приготовление буферного раствора для электрофореза. В мерном цилиндре смешивают: трис – 4,84 г, ледяная уксусная кислота – 1,2 мл, ЭДТА из раствора 0,5 М – 100 мл, общий объем доводят дистиллированной водой до 1 л. Бромистый этидий добавляют до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Приготовление буфера для нанесения образцов (ОБ). В 100 мл дистиллированной воды вносят бромфеноловый синий – 0,25 г, фикол – 15 г.

Приготовление 2 %-го агарозного геля. К 1,0 г агарозы добавляют 50 мл буферного раствора для электрофореза. Смесь в термостойкой колбе нагревают в кипящей водяной бане, пока агароза не расплавится, после охлаждения агарозы до температуры 50 °С выливают на подготовленный столик аппарата для электрофореза (типа ПГ-9), при этом образуется слой агарозы высотой 4 мм. С помощью специального штампа – «гребенки» на катодном конце геля формируют лунки для нанесения проб. Между дном лунок и основанием геля должен оставаться слой агарозы 0,5 мм.

Буферные емкости аппарата ПГ-9 заполняют буферным раствором для электрофореза, при этом он должен покрывать гель слоем 4—5 мм. При необходимости разделения фрагментов ДНК, отличающихся на 20—50 пн, используют 2,5—3,0 %-й агарозный гель.

2) Проведение электрофореза.

По окончании ПЦР к 15—20 мкл реакционной смеси добавляют 1—2 мкл 10х буфера ОБ. Смеси вносят в лунки геля под буферный раствор для электрофореза с помощью микродозатора.

Электрофорез проводят при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 45—90 мин, пока краситель (бромфеноловый синий) не пройдет от катодного конца геля 6—8 см (для разделения фрагментов ДНК, отличающихся на 20—50 пн, – 10—20 см).

Окрашенную бромистым этидием ДНК в геле просматривают под ультрафиолетовым излучением, для чего используют трансиллюминатор с длиной волны 254 нм. Гель фотографируют в проходящем ультрафиолете цифровой камерой Olympus.

При использовании ПЦР для детекции полиморфизмов результаты оценивают по наличию в геле фрагментов ДНК, полоски которых располагаются на том же уровне, что и в положительном контроле (имеют аналогичные размеры).

3.7. Интерпретация результатов

При выполнении исследования подсчитывают процент гомозигот и гетерозигот. Частоты аллелелей использовались в дальнейшем для расчёта их распространенности в популяциях. Расчетная распространенность аллелей изучаемых генов в среднеевропейской популяции сравнивалась с цитируемой по данным специальных источников литературы.

Результаты интерпретировались на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флюоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (N) в соответствующей графе в таблице результатов, отображаемой в программном обеспечении для амплификатора CFX96.

По соотношению пороговых циклов, полученных по двум каналам детекции, определяли состояние гена в исследуемом участке ДНК (метод аллельной дискриминации). Возможных вариантов состояния гена было два: гомозиготное – в случае, когда одно из значений порогового цикла не определяется (ниже пороговой линии), и гетерозиготное – в случае, когда получено два значения пороговых циклов и по этим каналам получены параболические кривые флюоресценции. В зависимости от того, накопление какого продукта амплификации происходило в реакции, устанавливалось гомозиготное нормальное или минорное состояние гена.

При проведении массовых исследований регистрировались частоты аллельных вариантов изучаемых генов и частоты состояний генов (генотипов):

Состояние гена (генотип)	Нормальный аллель	Минорный аллель
Нормальное гомозиготное	*CYP1A1 – GG и TT* *CPOX – AA* *TNF – GG*	отсутствует
Гетерозиготное	*CYP1A1 – G и T* *CPOX – A* *TNF – G*	*CYP1A1 – A и C* *CPOX – C* *TNF – A*
Минорное гомозиготное	отсутствует	*CYP1A1 – AA и CC* *CPOX – CC* *TNF – AA*

Частоты аллелелей использовались в дальнейшем для расчёта их распространенности в популяциях. Из литературы известны распространенности минорных аллелей изучаемых генов в среднеевропейской популяции.

Распространенность минорного аллеля рассчитывалась по формуле:

$$P_i = \frac{Чmho \times 2 + Чhet}{2 \times N} \times 100\ \%,\ \text{где}$$

P – распространенность минорного аллеля в группе;

Чmho – число лиц с минорным гомозиготным генотипом;

Чhet – число лиц с гетерозиготным генотипом;

N – количество обследованных лиц.

В дальнейшем рассчитывался коэффициент распространенности минорных аллелей для изучаемых генов по формуле:

$$Кр = \frac{P_{CYP} + P_{CPOX} + P_{TNF}}{3},\ \text{где}$$

Кр – коэффициент распространенности минорных аллелей в группе;

P – распространенности минорных аллелей соответствующих генов.

Коэффициент распространенности минорных аллелей в группе не должен был превышать 10 %.

Пример апробации методики на детях европеоидной расы, проживающих в условиях внешнесредовой экспозиции бенз(а)пиреном (исследуемая группа):

ОНП	Генотип	Контрольная популяция,% $N = 33$	Исследуемая популяция,% $N = 188$
CYP1A1 -9893A/G	A/A*	0 % (0)	4 % (8)
	A/G**	12 % (4)	19 % (36)
	G/G***	88 % (29)	77 % (144)
	G****	92 %	86 %
	A*****	8 %	14 %
ФНО-альфа G308A	A/A*	0 % (0)	3 % (5)
	A/G**	6 % (2)	22 % (41)
	G/G***	94 % (31)	75 % (142)
	G****	97 %	86 %
	A*****	3 %	14 %

Примечание:
* – патологическая гомозигота;
** – гетерозигота;
*** – нормальная гомозигота;
**** – нормальный аллель;
***** – патологический аллель (минорный, мутантный)

Распространенность патологической гомозиготы по гену CYP1A1 (-9893A/G) в исследуемой и контрольной группе составила 4 и 0 % соответственно, а распространенность мутантного аллеля А в них составила 14 и 8 %. CYP1A1 характеризуется преимущественно монооксигеназной активностью, которая индуцируется полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ), и он, участвуя в промежуточном обмене многих эндогенных метаболитов, кроме того, осуществляет активацию бенз(а)пирена. Высокая активность этого фермента ассоциирована с заменой нуклеотида и сопровождается повышенным риском онкозаболеваний при воздействии ПАУ.

Распространенность патологических гомозигот по гену ФНО-альфа в исследуемой и контрольной группе составила 3 и 0 % соответственно, а распространенность мутантного аллеля А в них составила 14 и 3 %. У гомозиготных носителей аллеля А (замена G308A в гене ФНО-альфа) не происходило адекватного иммунного ответа на антиген. Индивиды с носительством минорного аллеля в промоторной области гена ФНО-альфа были ассоциированы с нарушениями дифференцировки клеток, аутоиммунными, инфекционными заболеваниями.

Многосредовая комбинированная экспозиция техногенными химическими мутагенами (бенз(а)пирен, бензол, формальдегид, хлороформ, фенолы, ванадий и др.), характеризующаяся повышенными, относитель-

но референтных пределов, концентрациями в крови детей и работающих, ведет к возникновению генетических и эпигенетических нарушений. Для подтверждения реализации особенностей генетического полиморфизма требуется медико-химическое и клинико-лабораторное тестирование негативного воздействия техногенных химических факторов на организм человека.

Критерии гигиенической оценки (маркеры неблагоприятных эффектов) рекомендуется использовать для определения степени выраженности популяционных изменений в соответствии с уровнем распространенности генетических и эпигенетических изменений в популяции, подвергающейся воздействию техногенных химических факторов (прилож. 1). В качестве основного гигиенического критерия генетических нарушений под воздействием ТХФ предлагается уровень распространенности минорного аллеля по предлагаемым маркерам генетического полиморфизма, который не должен превышать 10 %.

Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов: цитохром-450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP17A1, CYP2C19), MTHFR, APO-E, гены PPARA, PPARD, PPARG, CPOX, GSTP1,VEGF, NO-синтаза, ACE, IL4, TNFальфа, HLA DR, p53, BRCA1, BRCA2.

В отличие от моногенных болезней, где нередко стоит задача идентификации неизвестной мутации в известном гене, при изучении аллельных ассоциаций мультифакториальных заболеваний объектом исследования являются уже известные полиморфные сайты, информацию о которых можно найти в соответствующих ДНК-базах, опубликованных в Интернете (прилож. 2).

Результаты генетического тестирования требуют в дальнейшем разработки практических рекомендаций, направленных на обеспечение групп риска измененного полиморфизма специальными программами профилактики и минимизации мутагенного воздействия техногенных факторов.

Примечание. Результаты генетического тестирования имеют практическую значимость, если они основаны на анализе генов, ассоциация которых характерна и значима для популяции данного региона. Эффективность использования такой информации во многом определяется уровнем генетических знаний врачей, их умением применять полученные данные для диагностики, профилактики и лечения заболеваний. Генетическое тестирование на индивидуальном уровне дает только качественные результаты, требующие дополнительного биохимического и иммунологического тестирования функциональной активности исследованных генов.

4. Библиографические данные

• Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

• Р 2.1.10.1920—04 «Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду».

• Сборник нормативно-методической документации по профпатологии и гигиене труда. Уфа, 1998. 80 с.

• МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

• МУК 4.2.2305—07 «Определение генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генно-инженерно-модифицированные аналоги, в пищевых продуктах методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и ПЦР с электрофоретической детекцией».

Приложение 1

Перечень маркеров генетического полиморфизма для оценки воздействия неблагоприятных техногенных химических факторов

№ п/п	Ген	Полиморфизм	Области генетического кодирования
1	CYP1A1	T6235C, -9893A/G	1 фаза детоксикации
2	CPOX	921A/C	2 фаза детоксикации
3	GSTP1	A313G, C341G	2 фаза детоксикации
4	CYP1A2	1545T>C	1 фаза детоксикации
5	CYP17A1	rs1042386	1 фаза детоксикации
6	CYP2C19	G681A	1 фаза детоксикации
7	VEGF	rs2010963	Патогенетические гены
8	NO-синтаза	rs1799983	Патогенетические гены
9	MTHFR	C677T, A1298C	Патогенетические гены
10	ACE	I/D	Патогенетические гены
11	PPARA	M235T, T174M, G-6A	Патогенетические гены
12	PPARD	A486V	Патогенетические гены
13	PPARG	+9/-9	Патогенетические гены
14	IL4	T-1098G, T-590C	Иммунитет
15	TNFa	G-308A, G-238A	Иммунитет
16	HLA DR	rs3135388	Иммунитет
17	p53	rs17884159	Гены регуляции онкогенеза
18	BRCA1	rs3950989	Гены регуляции онкогенеза
19	BRCA2	rs1801439	Гены регуляции онкогенеза
20	APO-E	rs429358	Патогенетические гены

Приложение 2

Перечень ДНК-баз для поиска генетического полиморфизма

gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru