

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

24.06.2011

Регистрационный № 005-0211

**ДНК-ДИАГНОСТИКА ФЕНИЛКЕТОНУРИИ,  
ОБУСЛОВЛЕННОЙ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ  
ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканский научно-практический центр  
«Мать и дитя»»

АВТОРЫ: Ю.В. Цукерман, канд. биол. наук К.А. Моссэ

Минск 2011

Цель инструкции — молекулярно-генетическая диагностика фенилкетонурии путем идентификации мутаций в гене фенилаланингидроксилазы (ФАГ).

Область применения: медицинская генетика.

Уровень внедрения: ГУ РНПЦ «Мать и дитя».

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

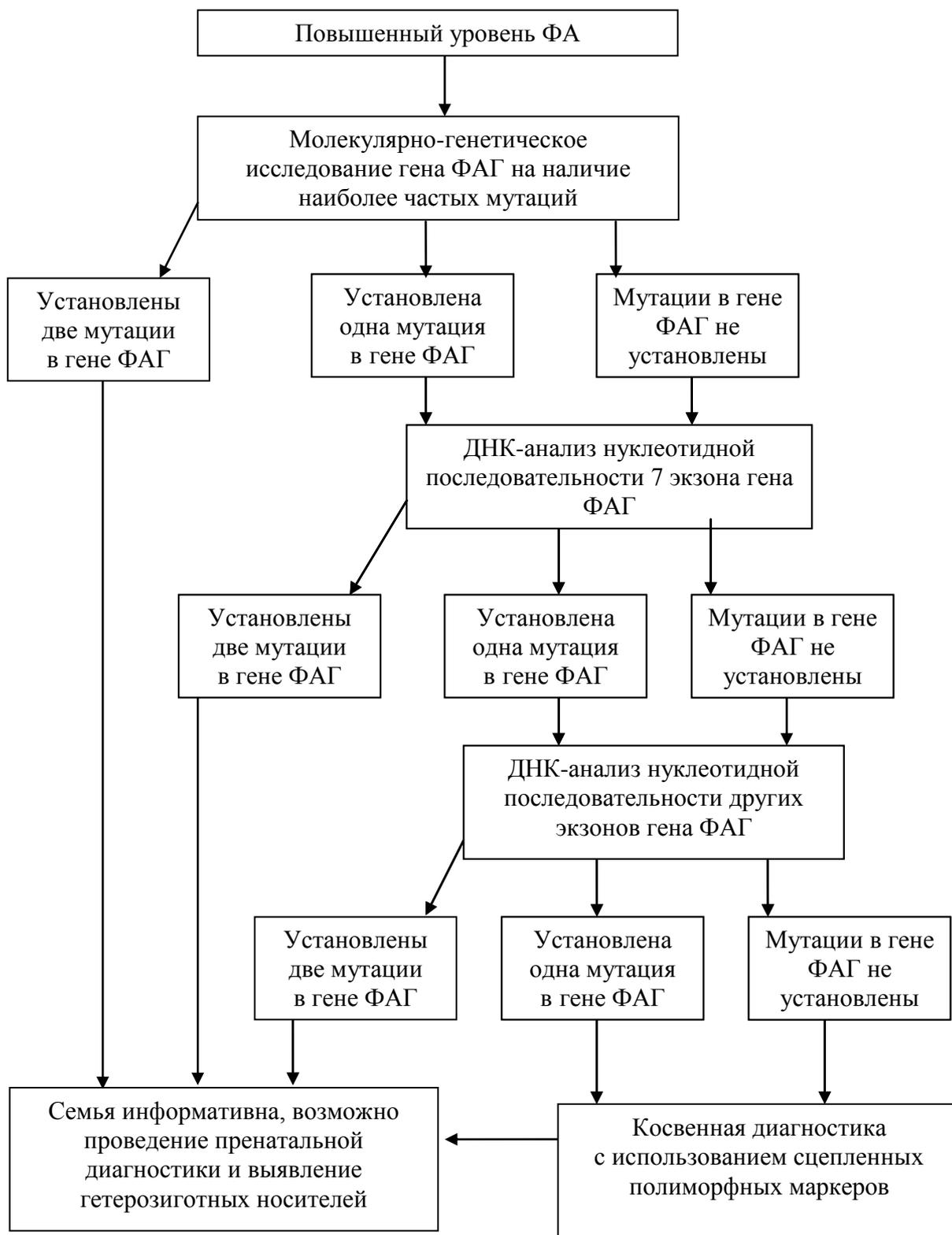
Молекулярно-генетический анализ может быть рекомендован:

- пациентам с фенилкетонурией (ФКУ), диагностированной по результатам неонатального биохимического скрининга;
- родственникам пробандов;
- супругам лиц, у которых установлено гетерозиготное носительство мутаций в гене ФАГ;
- для пренатальной диагностики в отягощенных семьях.

Алгоритм ДНК-диагностики фенилкетонурии отображен на рисунке 1.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.



**Рисунок 1 — Алгоритм ДНК-диагностики фенилкетонурии**

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **1. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

#### **1.1. Перечень необходимого оборудования и реактивов:**

- биологический материал для анализа — ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови;

- программируемый нагревательный блок (амплификатор), миницентрифуга, пробирки объемом 1,5 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

- реактивы: Термостабильная полимераза; соответствующий 10X буфер для ПЦР; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); праймеры, фланкирующие участок ДНК, содержащий анализируемую мутацию (табл. 2.1); бидистиллированная деионизированная вода (б/д).

### **1.2. Методика проведения ПЦР**

1.2.1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1xПЦР буфер, 1,5–2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP; по 5-10 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.

1.2.2. В пробирки для ПЦР внести по 19,5 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.

1.2.3. Пробирки поместить в амплификатор и провести денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95°C. Затем выполнить 35 циклов амплификации при соответствующих температурно-временных условиях. Денатурация проводится 30 с–1 мин при 95°C, а синтез — 45 с–1 мин при 72°C. Температура отжига зависит от температуры плавления праймеров, используемых для амплификации определенных фрагментов ДНК, и может составлять от 54 до 58°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72°C.

1.2.4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

## **2. Идентификация диагностически значимых мутаций гена ФАГ методом ПДРФ**

### **2.1. Перечень необходимого оборудования и реактивов:**

- перечень оборудования для ПЦР приведен в разделе 1.

Для амплификации фрагментов 5 и 12 экзонов использовали 3 пары праймеров:

Последовательность праймера	Экзон	Температура отжига, °C
12A (F):ATGCCACTGAGAACTCTCTT 12B (R):AGTCTTCGATTAAGTGAAGAA	12	55
12A (F):ATGCCACTGAGAACTCTCTT 12BIVS12NT1Ra(R):CTCGTAAGGTGTAATTAACGTA	12	55
R158Q (F):CCTGTGTACCGTGCAAGC 5B (R):TCATGCTGGTATTTTCATCC	5	58

### *Рестрикция продуктов ПЦР специфическими эндонуклеазами*

Материалы и оборудование: термостат, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: эндонуклеазы StyI, DdeI, RsaI и соответствующий буфер для проведения рестрикции.

### *Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в полиакриламидных гелях*

Материалы и оборудование: камера для вертикального или горизонтального электрофореза, источник постоянного тока, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: бромфеноловый синий, ксиленцианол, 40% раствор сахарозы, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, трис, ЭДТА, борная кислота, персульфат аммония, TEMED, маркер молекулярного веса pBR322/*MspI*, б/д.

#### *Визуализация ДНК*

Материалы и оборудование: кювета для окрашивания, трансиллюминатор, камера для фотографирования гелей.

Реактивы: бромистый этидий, H<sub>2</sub>O.

### **2.2. Методика определения мутаций гена ФАГ**

Методика проведения ПЦР приведена в разделе 1.

#### *Проведение рестрикции*

К 10 мкл продукта ПЦР добавить 1,2 мкл десятикратного рестрикционного буфера и 0,5 мкл (5 единиц активности) соответствующей эндонуклеазы (таблица 1). Центрифугировать несколько секунд. Пробирки инкубировать в течение 12 ч при 37°C.

### *Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в полиакриламидных гелях*

Приготовление растворов:

- 40% раствор полиакриламида (соотношение мономеров 19:1): 38 г акриламида, 2 г N,N'-метиленабисакриламида, H<sub>2</sub>O до 100 мл;
- 10X трис-боратный (ТВЕ) буфер: 3,72 г ЭДТА, 27,5 г борной кислоты, 54 г триса, H<sub>2</sub>O до 500 мл.
- 20% персульфат аммония: 0,2 г персульфата, H<sub>2</sub>O до 1 мл.
- 6X погружающий буфер для нанесения проб: 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленцианол, 40% (вес/объем) сахароза.

Метод:

1. Подготовить камеру к заливке геля.
2. Приготовить соответствующий гель: для приготовления 15 мл 8% геля с соотношением мономеров 19:1 смешивать 3 мл 40% полиакриламида, 1,5 мл 10X ТВЕ, 11,5 мл H<sub>2</sub>O, 60 мкл 20% персульфата аммония, 20 мкл TEMED.
3. В пробирки, содержащие ПЦР-продукт, добавить 1/6 объема буфера для нанесения проб.
4. В лунки геля микропипеткой нанести образцы. В крайние левую и правую лунки нанести маркер молекулярного веса.
5. Камеру подключить к источнику тока. Электрофоретическое разделение проводить при 300–330 В.

#### *Визуализация ДНК*

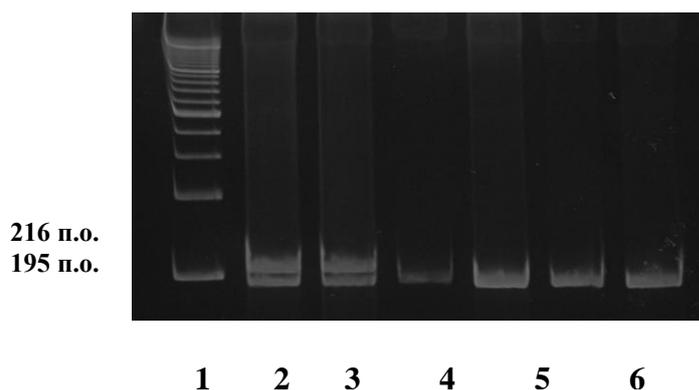
После окончания электрофореза гель поместить в кювету с раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) на 5–10 мин. Анализ и фотографирование электрофореграмм проводят в ультрафиолетовом свете.

#### *Интерпретация полученных данных*

Определение аллелей проводят по наличию и положению фрагментов ДНК, разделенных в полиакриламидном геле (таблица, рисунок 2).

Таблица — Принцип идентификации мутаций в гене ФАГ

Мутация	Экзон	Рестриктаза	Размер анализируемых фрагментов
R408W	12	StyI	ПЦР-продукт — 249 п.о. После рестрикции: н/н — 249 п.о.; н/м — 249 п.о. + 152 п.о. + 97 п.о.; м/м — 152 п.о. + 97 п.о.
R158Q	5	DdeI	ПЦР-продукт — 157 п.о. После рестрикции: н/н — 137 п.о. + 20 п.о.; н/м — 137 п.о. + 157 п.о. + 20 п.о.; м/м — 157 п.о.
IVS 12+1g>a	12	RsaI	ПЦР-продукт — 216 п.о. После рестрикции: н/н — 195 п.о. + 21 п.о.; н/м — 216 + 195 + 21; м/м — 216.



1 — маркер молекулярного веса; 2, 3 — гетерозиготный носитель мутации IVS 12+1g>a;  
4–7 — мутация IVS 12+1g>a отсутствует

**Рисунок 2 — Электрофореграмма продуктов рестрикции 12 экзона гена ФАГ (определение мутации IVS 12+1g>a методом ПДРФ-анализа)**

### **3. Идентификация мутаций в гене ФАГ методом дВЭЖХ и ресеквенирования**

#### **3.1. Перечень необходимого оборудования и реактивов**

Биологический материал и проведение ПЦР см. в разделе 1.

Для амплификации экзонов гена ФАГ использовали следующие пары праймеров:

Последовательность праймера	Размер продукта, п.о.	Температура отжига, °С
PAH1F CAA GAG ACA CCC TTT GTA AC PAH1R CAG CAG TCT TCG GAT CTC TT	265	55
PAH2F TTC ATG CTT GCT TTG TCC PAH2R CTG TTC CAG ATC CTG TGT TC	299	50
PAH3F TGT GAC TGT CTC CTC ACC PAH3R GAC ATG TGA GTT ACT TAT GTT G	265	50
PAH4F TGT ACT CAG GAC GTT GCC TTC PAH4R CTC ATC TAC GGG CCA TGG AC	146	54
PAH5F AAG CAT TCA TAA AGG TAC CAG PAH5R AAG GGA GAA GCA GGC TAG	202	52
PAH6F TAA CCT GCA TTC TGC TGT G PAH6R TCC TCT GCC TCA ATC CTC	317	53
PAH7F TGC CTC TGA CTG AGT GGT G PAH7R AAG ATG GCG CTC ATT GTG	242	55
PAH8F CTG CCC ATT CCT CAT GTA GA PAH8R CTG GGC TCA ACT CAT TTG AG	226	56
PAH9F ATG GCC AAG TAC TAG GTT G PAH9R AGT TTC AAA GAC CTG AGG GC	199	54
PAH10F TCC CAG TCA AGG TGA CAC PAH10R GGA TAC AAA TAG GGT TTC AAC	260	50
PAH11F TGC AGC AGG GAA TAC TGA TC PAH11R TAG ACA TTG GAG TCC ACT CTC	293	56
PAH12F ATG CCA CTG AGA ACT CTC TT PAH12R AGT CTT CGA TTA CTG AGA AA	245	50
PAH13F TCA CTA GGA CAC TTG AAG AG PAH13R TCT CCA TCA ACA GAT TCA C	163	48

*Денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (дВЭЖХ)*

Материалы и оборудование: жидкостной хроматограф в комплектации, позволяющей выполнять анализ по технологии дВЭЖХ, рН-метр, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: триэтиламин, ацетонитрил, Na<sub>2</sub>EDTA, ледяная уксусная кислота, б/д.

*Проведение секвенирующей реакции*

Материалы и оборудование: программируемый нагревательный блок (амплификатор), миницентрифуга, пробирки объемом 1,5 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: набор для проведения реакции секвенирования, 5X буфер, прямой праймер, б/д.

*Автоматический капиллярный электрофорез*

Материалы и оборудование: генетический анализатор с программным обеспечением для секвенсного анализа, вортекс, программируемый термостат, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: формамид, 4% раствор полимера для заполнения капилляра, 10X ЭДТА буфер, б/д.

### **3.2. Методика идентификации мутаций**

Методику проведения ПЦР см. в разделе 1.

*Денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (DHPLC)*

Приготовление буферных растворов:

Буфер А (рН 7,0): триэтиламин — 14 мл, Na<sub>2</sub>EDTA — 0,037 г (Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O — 0,041 г), добавить 800 мл б/д воды, рН довести ледяной уксусной кислотой, довести до 1 л б/д водой.

Буфер В (рН 7,0): триэтиламин — 14 мл, Na<sub>2</sub>EDTA — 0,037 г (Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O — 0,041 г), добавить 600 мл б/д воды, рН довести ледяной уксусной кислотой, ацетонитрил — 250 мл, довести до 1 л б/д водой.

Подготовку оборудования к работе выполнить в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ проводить при следующих параметрах:

- скорость буферного потока — 0,45 мл/мин;
- температура колонки — 55–57°C;
- время инъекции образца в колонку — 5 с;
- время разделения — 8 мин.

*Проведение секвенирующей реакции*

В пробирки для ПЦР внести по 4 мкл смеси реагентов из набора для проведения реакции секвенирования, 2 мкл буфера, 2 пмоль прямого праймера, 4 мкл ПЦР-продукта и довести б/д водой до 20 мкл.

Пробирки поместить в амплификатор и провести 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 10 с денатурации при 96°C, 4 мин отжига и синтеза при 60°C.

После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

*Автоматический капиллярный электрофорез*

Подготовку к работе генетического анализатора выполнить в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ производить при следующих параметрах:

- длина капилляра — 36 см;
- заполнение капилляра 4% полимером;
- температура — 50°C;
- время инъекции образца в капилляр — 5 с;
- время разделения — 32 мин;
- напряжение — 11 кВ.

Подготовка проб:

1. В пробирку с высушенным продуктом реакции секвенирования добавить 15 мкл формамида.

2. Встряхивать на вортексе до полного растворения.

3. Пробу денатурировать 2 мин при 95°C.

4. После денатурации пробирку с пробами быстро охладить во льду.

5. Установить необходимое количество микропробирок в штатив анализатора.

6. Перенести весь объем пробы в микропробирки.

Анализ проб:

1. Установить штатив в анализатор.

2. Задать необходимые параметры анализа в программе сбора данных.

3. Запустить программу сбора данных.

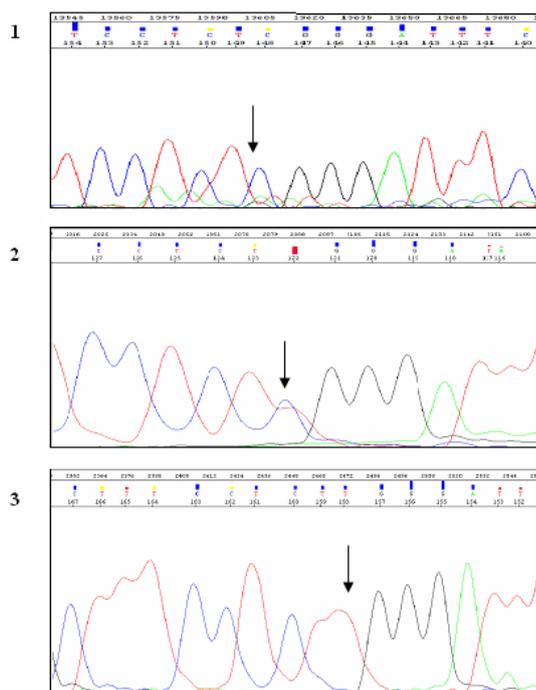
4. После окончания разделения образцов и сбора данных перенести результаты в программу анализа данных.

5. Проанализировать полученные данные.

*Интерпретация полученных данных*

При выполнении денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии наличие сдвигов в нуклеотидной последовательности определяют по присутствию дополнительных пиков на хроматограмме или изменению ее профиля.

При выполнении прямого секвенирования идентификацию мутаций проводят исходя из зафиксированных на электрофореграмме изменений в последовательности нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК (рисунок 3).



1 — норма; 2 — мутация в гетерозиготном состоянии; 3 — мутация.  
Стрелкой отмечено место нуклеотидной замены

**Рисунок 3 — Результаты секвенирования 7 экзона гена ФАГ**

## 4. Определение аллелей полиморфных маркеров гена ФАГ

### 4.1. Перечень необходимого оборудования и реактивов

Биологический материал и проведение ПЦР см. в разделе 1.

Для амплификации участка 3'-нетранслируемого региона гена ФАГ, содержащего VNTR-повторы, использовали следующие праймеры:

VNTR (F): CTT GGA AAC TTA AGA ATC CCA TC

VNTR (R): AGA TTT TAA TGT TCT CAC CCG CC

Для амплификации участка 3 интрона гена ФАГ, содержащего STR-повторы, использовали вариант прямого праймера STR1 с меткой 6-FAM на 5' конце:

PAHSTR1 (F): 6-FAM-GCC AGA ACA ACT ACT GGT TC

PAHSTR2 (R): AAT CAT AAG TGT TCC CAG AC

*Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в полиакриламидных гелях*

Материалы и оборудование: камера для горизонтального фореза, камера для вертикального электрофореза, источник постоянного тока, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: бромфеноловый синий, ксиленцианол, 40% раствор сахарозы, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, трис, ЭДТА, борная кислота, персульфат аммония, TEMED, маркер молекулярного веса pBR322/MspI, H<sub>2</sub>O.

*Визуализация ДНК*

Материалы и оборудование: кювета для окрашивания, трансиллюминатор, камера для фотографиярования гелей.

Реактивы: бромистый этидий, H<sub>2</sub>O.

*Автоматический капиллярный электрофорез с полихромным лазерным сканированием*

Материалы и оборудование: генетический анализатор с программным обеспечением, программируемый термостат, миницентрифуга, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: маркер молекулярного веса, деионизированный формамид, 4% раствор полимера для заполнения капилляра, 10X ЭДТА буфер, H<sub>2</sub>O.

### 4.2. Методика определения аллелей

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 20 мкл на реакцию. Смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 1xПЦР буфер, 1,5–2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP; по 5 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq полимеразы.

2. В пробирки для ПЦР внести по 19,5 мкл амплификационной смеси и образец ДНК.

3. Пробирки поместить в амплификатор и провести амплификацию при следующих температурно-временных условиях:

А. Для амплификации VNTR-повторов: начальная денатурация 5 мин при 95°C, затем 4 длинных цикла (95°C — 2 мин, 57°C — 2 мин, 72°C — 4 мин) и 30 циклов амплификации (95°C — 1 мин, 57°C — 1 мин, 72°C — 1 мин). На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72°C.

Б. Для амплификации STR-повторов: начальная денатурация 5 мин при 95°C, затем 25 циклов амплификации (95°C — 30 с, 56°C — 22 с, 72°C — 22 с). На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются 7 мин при 72°C.

4. После окончания ПЦР пробы помещают в холодильник.

*Определение аллелей VNTR, методом электрофоретического разделения продуктов ПЦР в полиакриламидных гелях*

1. Подготовить камеру к заливке геля.

2. Приготовить соответствующий гель:

для приготовления 15 мл 8% геля с соотношением мономеров 19:1 смешивать 3 мл 40% полиакриламида, 1,5 мл 10X TBE, 11,5 мл H<sub>2</sub>O, 60 мкл 20% персульфата аммония, 20 мкл TEMED.

3. В пробирки, содержащие ПЦР-продукт, добавить 1/6 объема буфера для нанесения проб.

4. В лунки геля микропипеткой нанести образцы. В крайние левую и правую лунки нанести маркер молекулярного веса.

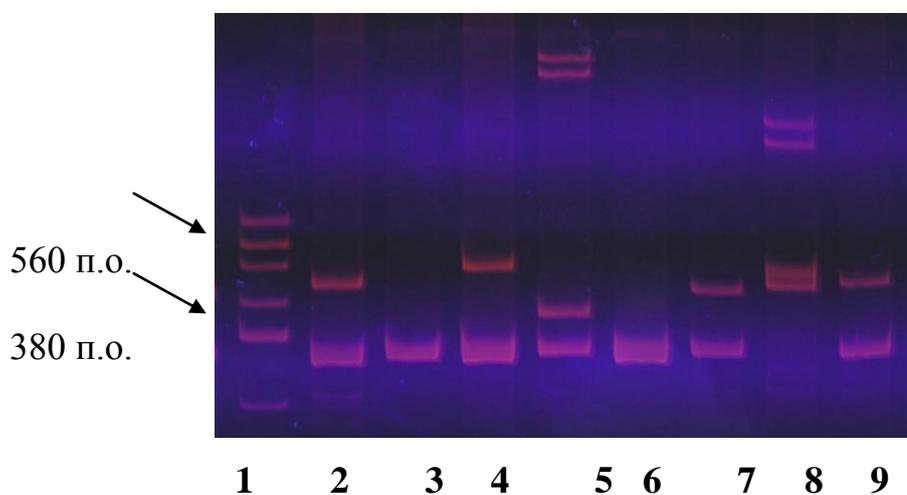
5. Камеру подключить к источнику тока. Электрофоретическое разделение проводить при 270 В.

*Визуализация ДНК*

После окончания электрофореза гель поместить в кювету с раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Окрашивание происходит в течение 5-10 мин. Анализ и фотографирование электрофореграмм проводятся в ультрафиолетовом свете.

*Интерпретация полученных данных*

Определение аллелей проводят по наличию и положению фрагментов ДНК, разделенных в полиакриламидном геле (рисунок 4).



1 — маркер молекулярной массы; 2 — аллели 380/530; 3, 6 — аллели 380/380; 4 — аллели 380/560; 5 — аллели 380/470; 7 — аллели 380/500, 8 — аллели 500/560; 9 — аллели 380/500

**Рисунок 4 — Электрофореграмма VNTR аллелей гена FAG**

*Определение STR повторов гена FAG методом автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием*

1. Из каждой пробы забрать 0,7 мкл амплификата, смешать с 0,6 мкл маркера молекулярного веса ROX 350 (Applied Biosystems) и 8,5 мкл деионизированного формамида.

2. Смесь денатурировать 2 мин при 95°C. После денатурации пробы поставить на лед на 3–5 мин.

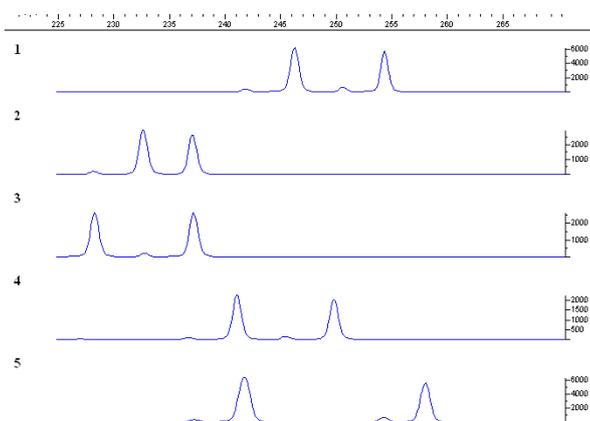
3. Электрофорез проводят при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр 5 с, время разделения 24 мин, напряжение 7,5 кВ, длина детектора 36 см.

4. Для разделения используется 4% раствор полимера POP-4™ (Applied Biosystems).

5. Обработку данных и определение аллелей выполняют с помощью пакета компьютерных программ GENESCAN (Applied Biosystems).

#### *Интерпретация полученных данных*

Определение аллелей проводят по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа (рисунок 5).



1 — аллели 246/254; 2 — аллели 234/238; 3 — аллели 226/238; 4 — аллели 242/250;  
5 — аллели 242/258

**Рисунок 5 — Варианты аллелей гена ФАГ с различным числом ТСТА повторов, идентифицированные в ходе исследования**

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Для предотвращения диагностических ошибок надо соблюдать следующие правила:

- использовать только химически чистую и желательнее стерильную посуду;
- использовать одноразовые пробирки и наконечники для пипеток;
- стерилизовать применяемые растворы (если допустима их стерилизация) и хранить их разлитыми небольшими порциями;
- работать только с минимально необходимыми объемами растворов;
- перед открыванием крышек пробирок осажать растворы со стенок центрифугированием;
- в каждую серию проб включать отрицательный контроль;
- при выделении ДНК и постановке ПЦР работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

В лаборатории необходимо выделять несколько зон:

- зона экстрагирования ДНК — в ней осуществляют все этапы обработки биологического материала и выделения геномной ДНК;
- зона проведения ПЦР предназначена для внесения в пробирки компонентов амплификационной смеси и ДНК, а также для амплификации. В зонах экстрагирования ДНК и проведения ПЦР не следует открывать пробирки с продуктами амплификации, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне;
- зона анализа продуктов ПЦР — в ней проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.