

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«30»  2018 г.

Регистрационный № 114-1118

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ,  
ОБУСЛОВЛЕННЫХ НАРУШЕНИЕМ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ  
МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ УГЛЕВОДНЫЕ  
КОМПОНЕНТЫ, И ТАКТИКА МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО  
КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ**  
инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

Авторы:

к.б.н. Гусина Н.Б., к.м.н Гусина А.А., Криницкая К.А., Зиновик А.В.,  
Стальбко А.С.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

30.11.2018

Регистрационный № 114-1118

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ,  
ОБУСЛОВЛЕННЫХ НАРУШЕНИЕМ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ  
МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ УГЛЕВОДНЫЕ  
КОМПОНЕНТЫ, И ТАКТИКА МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО  
КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук Н. Б. Гусина, канд. мед. наук А. А. Гусина,  
К. А. Криницкая, А. В. Зиновик, А. С. Сталыбко

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики наследственных заболеваний, обусловленных нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты (наследственных дефектов процессинга гликопротеидов, наследственных нарушений гликозилирования, CDG-синдромов), и тактика медико-генетического консультирования, которые могут быть использованы в комплексе мероприятий по оказанию медицинской помощи пациентам с заболеваниями и патологическими состояниями, обусловленными наследственными нарушениями гликозилирования, и их семьям. Наследственные заболевания, обусловленные нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты, весьма многочисленны. Основные понятия и термины, используемые при описании этих состояний, а также их номенклатура и классификация изложены в приложении 1 к инструкции.

Инструкция предназначена для врачей-генетиков, врачей лабораторной диагностики и других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь этой категории пациентов в амбулаторных и стационарных условиях.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Оборудование, реагенты и реактивы для выделения ДНК.
2. Оборудование и реагенты для полимеразной цепной реакции (ПЦР).
3. Оборудование и реагенты для секвенирования по Сенгеру.
4. Оборудование, реагенты и реактивы для изоэлектрического фокусирования трансферрина.
5. Аппаратное и программное обеспечение для анализа и документации полученных результатов.

Подробный перечень необходимого оборудования, реагентов и реактивов представлен в приложении 2 к инструкции.

#### **Материал для исследования**

Биологический материал для исследования:

для молекулярно-генетических исследований — ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, фибробластов, ворсин хориона, культивируемых амниоцитов, образцов тканей;

для изоэлектрического фокусирования трансферрина — сыворотка крови;

для определения активности арилсульфатазы А и других лизосомных ферментов — сыворотка крови, культура фибробластов кожи.

#### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Задержка физического и психомоторного развития или умственная отсталость любой степени в сочетании с:

черепно-лицевой дисморфией;

симптомами поражения мозжечка;

эпилепсией;

скелетными деформациями;  
симптомами поражения желудочно-кишечного тракта и печени, сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной, эндокринной системы, системы гемостаза и органа зрения.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **Диагностика наследственных заболеваний, обусловленных нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты**

Скрининг: изоэлектрическое фокусирование трансферрина, определение активности арилсульфатазы А в сыворотке крови.

Верификация диагноза: определение активности лизосомных ферментов ( $\beta$ -галактозидазы,  $\alpha$ -маннозидазы,  $\beta$ -маннозидазы,  $\alpha$ -фукозидазы, общей  $\beta$ -гексозаминидазы,  $\beta$ -гексозаминидазы А, кислой липазы, трипептидилпептидазы I) в сыворотке крови и фибробластах, секвенирование генов PMM2, GNPTAB, GNPTG.

*Этапы диагностики наследственных заболеваний, обусловленных нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты*

Скрининг — изоэлектрическое фокусирование трансферрина:

в профиле изоформ трансферрина присутствует только тетрасиалотрансферрин — наследственное нарушение N-гликозилирования исключено;

в профиле изоформ трансферрина присутствует а-, моно-, ди-, три- и тетрасиалотрансферрин — диагноз CDG-синдром II типа (класс по МКБ-10 нарушения обмена гликопротеидов неуточненные, E77.9);

в профиле изоформ трансферрина присутствует а-, ди- и тетрасиалотрансферрин — перейти к этапу верификации диагноза.

Верификация диагноза — секвенирование гена PMM2:

патогенные мутации в гене PMM2 выявлены — болезнь Жакена (класс по МКБ-10 — другие нарушения обмена гликопротеидов, E77.8) установлена;

патогенные мутации в гене PMM2 не выявлены — диагноз CDG-синдром I типа (класс по МКБ-10 — нарушения обмена гликопротеидов неуточненные, E77.9).

*Этапы диагностики муколипидозов II-III типа*

Задержка физического и психомоторного развития в сочетании с:

черепно-лицевой дисморфией;

скелетными деформациями.

Скрининг — определение активности арилсульфатазы А в сыворотке крови:

активность арилсульфатазы А в сыворотке крови в пределах нормальных значений (5,9-22 нмоль/ч) — диагноз муколипидоза II-III типа исключен;

активность арилсульфатазы А в сыворотке крови превышает нормальные значения, но ниже 200 нмоль/ч — изоэлектрическое фокусирование трансферрина;

активность арилсульфатазы А в сыворотке крови превышает 200 нмоль/ч на мл — этап верификации диагноза.

Верификация диагноза — определение активности  $\beta$ -галактозидазы,  $\alpha$ -маннозидазы,  $\beta$ -маннозидазы,  $\alpha$ -фукозидазы, общей  $\beta$ -гексозаминидазы,  $\beta$ -гексозаминидазы А, кислой липазы, трипептидилпептидазы I в сыворотке крови и фибробластах кожи (достаточно определить активность любых 4 перечисленных ферментов):

активность лизосомных ферментов в сыворотке крови и фибробластах в пределах нормальных значений — диагноз муколипидозов II-III типа исключен; перейти к изоэлектрическому фокусированию трансферрина;

активность лизосомных ферментов в сыворотке крови выше нормальных значений, а в фибробластах ниже — диагноз муколипидоза II-III типа (класс по МКБ-10 — дефекты посттрансляционной модификации лизосомных ферментов E77.0) установлен.

Секвенирование генов GNPTAB, GNPTG:

выявлены патогенные мутации в гене GNPTAB — диагноз муколипидоз II (III)  $\alpha/\beta$  (класс по МКБ-10 — дефекты посттрансляционной модификации лизосомных ферментов E77.0) установлен;

выявлены патогенные мутации в гене GNPTG — диагноз муколипидоз III  $\gamma$  (класс по МКБ-10 — дефекты посттрансляционной модификации лизосомных ферментов E77.0) установлен;

патогенные мутации в генах GNPTAB, GNPTG не выявлены — диагноз муколипидоз II-III типа (класс по МКБ-10 — дефекты посттрансляционной модификации лизосомных ферментов E77.0) установлен.

Не все патогенные мутации в генах GNPTAB, GNPTG можно выявить с помощью секвенирования. При наличии биохимических признаков: активность лизосомных ферментов в сыворотке крови выше нормальных значений, а в фибробластах — ниже диагноз муколипидоза II-III типа следует считать установленным независимо от того, выявлены патогенные мутации в генах GNPTAB, GNPTG или нет. Секвенирование генов GNPTAB, GNPTG необходимо для того, чтобы установить генотип пациента и его родителей для определения тактики пренатальной диагностики, а также классифицировать заболевание как муколипидоз II (III)  $\alpha/\beta$  либо как муколипидоз III  $\gamma$  для оценки прогноза заболевания.

### **Протокол изоэлектрического фокусирования трансферрина**

Приготовление водных растворов:

раствора 4,85 % акриламида, 0,15 % бис-акриламида, 10 % глицерина;

персульфата аммония 20 %;

фосфорной кислоты 0,1 моль/л;

гидроксида натрия 0,1 моль/л;

железа (II) аммония сульфата 0,02 моль/л;

трихлоруксусной кислоты 20 %;

сульфата меди 20 %;

раствора 0,1 % меди сульфата, 10 % уксусной кислоты, 30 % метанола;  
Кумасси бриллиантового синего 0,025 %.

Раствор персульфата аммония 20 % хранению не подлежит, готовить непосредственно перед употреблением. Срок годности раствора железа (II) аммония сульфата 0,02 моль/л — 1 мес. Срок годности остальных вышеперечисленных растворов, за исключением раствора персульфата аммония 20 % и раствора железа (II) аммония сульфата 0,006 моль/л — 1 год.

Приготовление полиакриламидного геля

Одно стекло для приготовления геля обработать реагентом для ингибирования прилипания полиакриламидного геля, а другое — реагентом, обеспечивающим плотное прикрепление геля согласно инструкции к реагентам.

Приготовить полиакриламидный гель размером 91x73x0,2 мм, содержащий T = 5 %; C = 3 %, 10 % глицерина, 6,25 % амфолита с pH 4-6,5, тетраметилэтилендиамина 0,8 %, аммония персульфата 0,25 %.

Подготовка образцов

Непосредственно перед изофокусированием к одному объему сыворотки крови добавить 2 объема раствора железа(II) аммония сульфата 0,02 моль/л, 1 объем меркаптоэтанола 2 % и 0,5 объема глицерина 87 %. Смесь инкубировать при комнатной температуре 1 ч.

Электрофорез

Гель на стекле, покрытом реагентом, обеспечивающим плотное прикрепление геля, положить на столик для изофокусирования так, чтобы электроды располагались по длине геля. Контакт его с электродами осуществлять через полоски фильтровальной бумаги. В качестве катодного и анодного буферов использовать 0,1 моль/л растворы натрия гидроксида и фосфорной кислоты соответственно. Образцы наносить с помощью аппликатора со стороны катода; объем образца 1 мкл. Режим работы источника питания: 3000 В, 2000 Вч, максимальный ток 5 мА. Продолжительность изофокусирования 45 мин, температура геля — 10 °С.

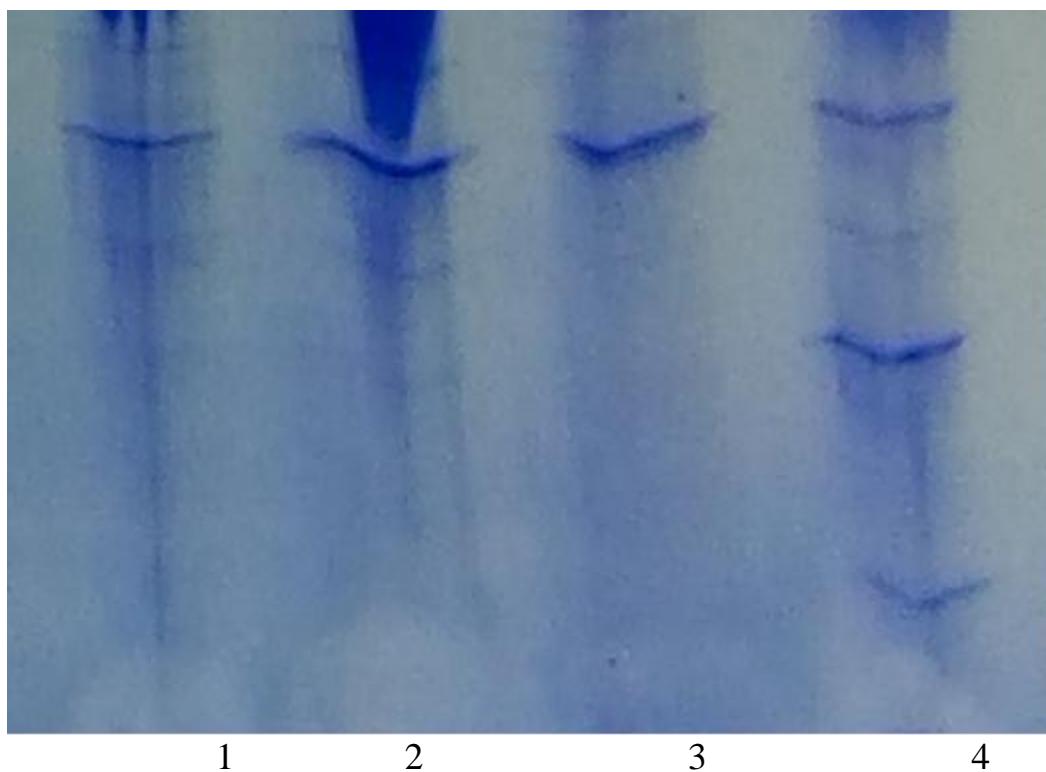
Окраска геля

Фиксировать гель в течение 10 мин в 20 % (масса/объем) растворе трихлоруксусной кислоты. Промыть гель в течение 5 мин в 50 мл раствора метанол/уксусная кислота/вода (25 : 8 : 68, об/об/об). Поместить гель в 0,1 % раствор красителя Кумасси бриллиантового синего R-250 на 15 мин при температуре 50 °С. Промыть гель в 50 мл раствора метанол/уксусная кислота/вода (25 : 8 : 68, об/об/об) покачиванием на орбитальном шейкере до обесцвечивания фона. Высушить гель в термостате при температуре 50 °С.

Интерпретация результатов

Профиль изоформ трансферрина следует считать нормальным, если на геле присутствует только один интенсивно окрашенный бэнд, соответствующий нормальной изоформе трансферрина — тетраасалотрансферрину, как показано на рисунке 1 (дорожки 1, 2, 3). Профиль изоформ трансферрина следует считать аномальным, если на геле присутствуют несколько бэндов, которые по интенсивности окраски

соответствуют или превосходят бэнд тетрасиалотрансферрина. На рисунке 1 (дорожка 4) присутствуют бэнды асиалотрансферрина, дисиалотрансферрина, которые расположены ниже бэнда тетрасиалотрансферрина и сопоставимы с ним по интенсивности окраски; также на этой дорожке присутствует бэнд трисиалотрансферрина очень слабой интенсивности. Такой аномальный профиль изоформ трансферрина наблюдается при CDG-синдромах I типа, в частности болезни Жакена.



**Рисунок 1. — Профиль гликозилирования трансферрина**

Аномальный профиль изоформ трансферрина, при котором на геле присутствуют бэнды асиалотрансферрина, дисиалотрансферрина, моно- и трисиалотрансферрина; с преобладанием последних наблюдается при CDG-синдромах II типа.

#### **Протокол секвенирования генов PMM2, GNPTAB, GNPTG**

Амплификация

Для ПЦР использовать 50-100 нг ДНК.

Составить общую реакционную смесь: амплификационный буфер (1x), смесь дезоксирибонуклеотидов 0,2 мМ каждого, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 пмоль каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакционный объем на 1 реакцию — 50 мкл: 49 мкл реакционной смеси и 1 мкл исследуемой ДНК.

Для ПЦР использовать праймеры, указанные в приложении 3:

Амплификационная программа: начальная денатурация 94 °С в течение 4 мин, 30 циклов со следующими параметрами – денатурация при температуре 94 °С в течение 30 с, отжиг праймеров при температуре, указанной в

приложении А в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 30 с. Конечная элонгация при 72 °С в течение 10 мин.

Терминирующая реакция

Перед терминирующей реакцией с мечеными дидезоксинуклеотидтрифосфатами необходимо произвести очистку амплификата. Для этого можно использовать метод преципитации с этанолом в соответствии со стандартным протоколом или коммерческие наборы реагентов (например, GeneJET PCR Purification Kit, «Thermo Fisher Scientific» или аналог).

Терминирующую реакцию производить в амплификаторе, используя коммерческий набор BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit «Thermo Fisher Scientific» или аналог. Составить реакционную смесь и выполнить реакцию секвенирования в соответствии с рекомендациями производителя реагентов. Для удаления несвязанных дидезоксинуклеотидтрифосфатов после амплификации произвести очистку постаmplификационной смеси методом преципитации с этанолом в соответствии со стандартным протоколом либо использовать коммерческие наборы реагентов (например, BigDye X Terminator Purification Kit, «Thermo Fisher Scientific» или аналог).

Полученные в реакции секвенирования флуоресцентно меченные одноцепочечные фрагменты ДНК разделить с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. Если для очистки продуктов секвенирования использовался метод преципитации с этанолом, то перед электрофорезом высушенные после этапа очистки образцы следует растворить в 20 мкл формамида, инкубировать 5 мин при 95 °С и перенести пробы на лед до электрофоретического разделения. Если для очистки использовали коммерческие наборы реагентов, то электрофорез следует производить в соответствии с рекомендациями производителя реагентов.

**Тактика медико-генетического консультирования пациентов с наследственными заболеваниями, обусловленными нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты, и членов их семей**

Медико-генетическое консультирование при наследственных заболеваниях, обусловленных нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты, проводится в соответствии с алгоритмом, представленным в приложении 4, который включает:

Сбор паспортных данных родителей пробанда.

Сбор акушерско-гинекологического анамнеза, в т.ч. отдельно по беременности пробандом.

Составление родословной не менее чем в трех поколениях с указанием любой врожденной или наследственной патологии в семье.

Полный клинический осмотр пробанда, консультации врачей-специалистов по показаниям.

Уточнение нозологического диагноза с помощью биохимических и молекулярно-генетических исследований.

Оформление медико-генетического заключения при установлении диагноза болезни Жакена, муколипидоза II-III типов.



Установление генотипа родителей пациента и определение тактики пренатальной диагностики.

Болезнь Жакена, муколипидоз II-III типов наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Риск повторения для sibсов пробанда составляет 25 %. В случаях, когда генотип пробанда известен, при наступлении беременности может быть рекомендована биопсия ворсин хориона и уточнение генотипа плода с помощью молекулярно-генетических исследований. В случае муколипидоза II-III типов, когда генотип пробанда не установлен, пренатальная диагностика может быть проведена во II триместре беременности с помощью биохимических исследований.

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

1. Ошибки, связанные с нарушением правил забора, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований. Для предупреждения ошибок этой группы необходимо тщательно соблюдать правила работы с биологическим материалом и инструкции по выполнению лабораторных исследований.

2. Ошибки при выполнении собственно лабораторных исследований, связанные с несоблюдением протоколов, использованием реагентов, утративших активность, загрязнением исследуемых образцов продуктами реакций и др. Для предупреждения таких ошибок необходимо соблюдать протоколы исследований, контролировать годность реагентов, использовать контрольные материалы и образцы.

Наследственные заболевания, обусловленные нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты, — редкие генетически детерминированные нарушения метаболизма, развитие которых обусловлено дефицитом активности ферментов, осуществляющих гликозилирование, т. е. модификацию белков и других макромолекул путем присоединения и изменения углеводных цепей. Различают N- и O-гликозилирование; первое происходит одновременно с процессом синтеза белка последовательно в цитоплазме клетки, гранулярном и гладком эндоплазматическом ретикулуме и завершается в аппарате Гольджи; O-гликозилирование, напротив, осуществляется после завершения синтеза белка преимущественно в аппарате Гольджи.

В МКБ-10 наследственные заболевания, обусловленные нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты, относят к классу E77 «Нарушения обмена гликопротеинов». В источниках литературы наряду с термином «наследственные заболевания, обусловленные нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты», используются термины «наследственные (врожденные) нарушения (дефекты) процессинга гликопротеидов (гликопротеинов)», «наследственные (врожденные) нарушения (дефекты) гликозилирования», «CDG-синдромы (Congenital Disorders of Glycosylation)», «синдромы гликопротеинов с карбогидратной недостаточностью». Все эти термины являются синонимами и обозначают одну и ту же группу заболеваний. Термин CDG-синдром I типа применяется для обозначения изолированных наследственных нарушений N-гликозилирования I типа. Термин CDG-синдром II типа применяется для обозначения изолированных наследственных нарушений N-гликозилирования II типа.

Классификация наследственных заболеваний, обусловленных нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты:

1. Изолированные нарушения N-гликозилирования:

1а. I тип (CDG-синдромы I типа) — дефекты синтеза углеводной части гликопротеина в эндоплазматическом ретикулуме.

1б. II тип (CDG-синдром II типа) — дефекты процессинга связанного с белком олигосахаридного остатка в эндоплазматической сети и аппарате Гольджи.

2. Изолированные нарушения O-гликозилирования:

2а. дефекты присоединения маннозы;

2б. дефекты присоединения фукозы;

2в. дефекты присоединения N-ацетилгалактозамина.

3. Комбинированные нарушения N- и O-гликозилирования.

4. Нарушения синтеза долихола.

5. Нарушения синтеза гликозилфосфатидилинозитола.
6. Нарушения дегликозилирования.
7. Нарушения посттрансляционной модификации лизосомных ферментов:
  - 7а. муколипидоз II (III)  $\alpha/\beta$ ;
  - 7б. муколипидоз III  $\gamma$ .

Изолированные дефекты N-гликозилирования — наиболее многочисленная группа наследственных заболеваний, обусловленных нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты.

*Номенклатура наследственных заболеваний, обусловленных нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты*

При обозначении наследственных нарушений гликозилирования вначале указывают официальное обозначение гена, с дефектом которого связано развитие заболевания, а затем через дефис сокращение CDG. В скобках указывают историческое (оригинальное) название. Например, PMM2-CDG (CDG-Ia). В оригинальной номенклатуре римские цифры I или II обозначают тип нарушений N-гликозилирования, а буквы — хронологический порядок опубликования первого описания болезни. В источниках литературы также можно встретить названия нарушений процессинга гликопротеидов, в которых упоминается фермент, с недостаточной функцией, например, дефицит фосфоманномутазы 2. Наиболее распространенное и хорошо изученное заболевание из наследственных нарушений посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты, с описания которого и началось собственно изучение всей этой группы, нередко называют по имени первооткрывателя: болезнь (синдром) Жакена. Таким образом, в источниках литературы при обозначении этого заболевания употребляются такие термины, как «PMM2-CDG (CDG-Ia)», «PMM2-CDG», «CDG-Ia», дефицит фосфоманномутазы 2, синдром с карбогидратной недостаточностью, тип Ia, болезнь (синдром) Жакена.

### **Оборудование, реагенты и реактивы для выделения ДНК**

#### *Оборудование*

Воздушный термостат с температурой 56 °С.

Центрифуга, 12 000 g.

#### *Реагенты и реактивы*

Протеиназа К.

Лаурилсульфат натрия.

Натрия хлорид.

Натрия ацетат.

Этанол.

Трис.

ЭДТА.

### **Оборудование и реагенты для выполнения полимеразной цепной реакции**

#### *Оборудование*

Амплификатор.

#### *Реагенты*

Праймеры.

Буфер для ПЦР.

Магния хлорид.

Комплект дезоксирибонуклеотидов.

Тақ-полимераза (или аналог).

### **Оборудование, реагенты и реактивы для изоэлектрического фокусирования трансферрина**

#### *Оборудование*

Камера для изофокусирования с охлаждением геля до 10 °С.

Блок питания с напряжением не менее 5000 В.

Стекла и сепараторы для приготовления геля.

Воздушный термостат с температурой 50 °С

Аппликаторы для внесения образцов на гель.

#### *Реагенты и реактивы*

Акриламид.

Бис-акриламид.

Глицерин.

Тетраметилэтилендиамин.

Аммония персульфат.

Амфолит рН 4–6,5.

Аммония-железа (II) сульфата гексагидрат.

Краситель Кумасси бриллиантовый синий R-250.

Меди сульфат пятиводный.

Реагент, предотвращающий прилипание геля к стеклу (например, Repel-Silane или аналог).

Реагент, обеспечивающий прилипание геля к стеклу (например, Bind-Silane или аналог).

Метанол.

Натрия гидроксид.

Фосфорная кислота.

Трихлоруксусная кислота.

**Оборудование и реагенты для секвенирования по Сенгеру**

*Оборудование*

Генетический анализатор.

*Реагенты*

Праймеры.

Набор BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit «Applied Biosystems» или аналог.

Этанол.

Ацетат натрия.

Трис.

ЭДТА.

**Аппаратное и программное обеспечение для анализа и документации полученных результатов**

Камера для фотографирования гелей.

Персональный компьютер.

Программное обеспечение Data Collection, SeqScape, Sequencing Analysis Software или аналогичное.

Таблица 1. — Нуклеотидная последовательность праймеров и условия ПЦР для амплификации экзонов гена PMM2

Экзон	Последовательность	Т отжига (°C)	Концентрация MgCl <sub>2</sub> (mM)	Длина ПЦР продукта (п.о.)
1	(F) GTTCCTCGTGCCAACGTGTC (R) AGCCCCAACTGGGAACAGCA	55	1,5	178
2	(F) GGTCTCCTGATTATTGTGTGG (R) TAGGGCAGCCTATGATACTTG	55	1,5	251
3	(F) TTCCTAGAGGCATTCATTGTG (R) GTTTTGATTCTTTGCATTCTAAG	55	1,5	205
4	(F) CTGGGTTTGCTATGAAGCTG (R) CCATGTGACACTACGCTATG	55	1,5	219
5	(F) AGGCTGTTTATCTATGTTGCC (R) CACCAGGCCATATCTTATTT	55	1,5	235
6	(F) GCCAGTAGTTAAACTGTGCT (R) CCACAACAACTCTGGGAAAT	55	1,5	206
7	(F) TCAGTGACATATCATTAGCCC (R) CCCCATCAAGCGCAAATGC	55	1,5	235
8	(F) TCCAGGGTCACATCAGCAAT (R) GAGCACGTGTGGGAGGAC	55	1,5	260

Таблица 2. — Нуклеотидная последовательность праймеров и условия ПЦР для амплификации экзонов гена GNPTG

Экзон	Последовательность, 5'-3'	Т отжига (°C)	Концентрация MgCl <sub>2</sub> (mM)	Длина ПЦР продукта (п.о.)
1-2	(F) ATCACGCCTCGCTCACCCCTGC (R) TACGGGAAGCGGCAAGGTCAG	64	1,5	560
3	(F) AGGTGCAGCGAAGATGAAGGT (R) GTCACTCATCCATCCTCCAC	60	1,5	267
4	(F) CAGACAGGTTCTGTGCTTGG (R) GGACACAGATGGCATGAGG	60	1,5	175
4-7	(F) CAGACAGGTTCTGTGCTTGG (R) CACTGGGCTCAACTGCGTC	60	1,5	659
8-9	(F) CTGAGCCTGGCTTCTCTTGG (R) GAGTTCAAGGGAAAGCCCAG	60	1,5	384
10-11	(F) CTGGGCTTTCCCTTGA ACTC (R) GTCCTACCAGCCAGCTTCTC	60	1,5	367

Таблица 3. — Нуклеотидная последовательность праймеров и условия ПЦР для амплификации экзонов гена GNPTAB

Экзон	Последовательность, 5'-3'	Т отжига (°C)	Концентрация MgCl <sub>2</sub> (mM)	Длина ПЦР продукта (п.о.)
1	(F) GTCGCCGGAGCTGCAATG (R) GGCAAAACCCCGTCTCTAATAATG	66	1,5	381
2	(F) CCACATCCTTTTAAACCTCTTTG (R) GCTAAAGTGAACACATCAGATGG	55	1,5	498
3	(F) CATAATCTCTGGGTTTAAACCCTGTG (R) CCTCCACCTCCACCTCCC	62	1,5	425
4	(F) CCGTCTTGTTACAGTGGGAGG (R) CCTCCCAGTGCAGTGAAGC	65	1,5	338
5	(F) GGTGGGGATCTTATTAATGGGAG (R) GGTAAAGGCCAAAATACAATAGC	59	1,5	608
6-7	(F) GTGTTCTGCCAGACACCATAGTTG (R) GGACCACAAGAAAAGAATCACAC	61	1,5	611
8	(F) GGGAGGCGGAGGTTGAGG (R) CCTCTCTGTAAGTCCCCTTCC	63	1,5	441
9-10	(F) GCACCTTGAGAGCAGACGGG (R) GATCCACCCACCTCCGCC	66,5	1,5	814
11	(F) CGCTCAGTAAGAACGGTCAACG (R) CCTCCCAGCTCAGCTTTGC	57	1,5	512
12	(F) CACCACACCCAGTCCAGAACTG (R) GCAAGGCTGGTAAAGGGATACAC	57	1,5	402
13 – A	(F) CAGAGGAAAAATGCCAGTT (R) GGTCTCCAAGTCCAGGGG	66	1,5	516
13 – B	(F) CAACAAGGAGAGCCCAGGAAG (R) GTTCCATGGCCGGCAC	66,5	1,5	383
14	(F) CCGTTAACATGTATTTTCATTTGC (R) GCAAACAACCTCAAACACGAGC	53	1,5	367
15	(F) GCTCGTGTTTGAGTTGTTTGC (R) TGTCTCAGCCTCCCAAGTAGC	64	1,5	664
16	(F) ACCACAGTCATTACTIONTACAATGCG (R) CCTGCTAGTTCTGAAGTGC	61	1,5	268
17	(F) CCTCCAGAGAGCATAGAATCAA (R) AGCCAGACCTTTGTGATTACTIONTCTT	56	1,5	254
18	(F) GTGGATGTTGAGTCCACTACGGT (R) СТАТСТСТСАСТСААССАССАСТС	61	1,5	353
19	(F) CCCATAGCTAAAAGGCCATCTACC (R) GTATACACTCACCCACACACATGC	58	1,5	436
20	(F) GAAGTCCTCTCTCCTGCCTGG (R) GACTGTTATATTTGCTGCCTGAA	65	1,5	507
21	(F) TTGGAAGAGGAATGATGGAGAT (R) GCAATCACTCCCAGCTGGC	62	1,5	590

**Тактика медико-генетического консультирования пациентов с наследственными заболеваниями, обусловленными нарушением посттрансляционной модификации белков, содержащих углеводные компоненты, и членов их семей**

