

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
\_\_\_\_\_ Е.Н.Кроткова  
\_\_\_\_\_ 24. 12. 2021 г.  
Регистрационный № 135 – 1121



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ  
СОСТОЯНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ  
*ADAMTSL4* И *CBS*, ПРОЯВЛЯЮЩИХСЯ ЭКТОПИЕЙ  
ХРУСТАЛИКА**  
инструкция по применению

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

Авторы:

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

Минск, 2021

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Е. Н. Кроткова

24.12.2021

Регистрационный № 135-1121

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ  
СОСТОЯНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ *ADAMTSL4*  
И *SBS*, ПРОЯВЛЯЮЩИХСЯ ЭКТОПИЕЙ ХРУСТАЛИКА**

инструкция по применению

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

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

Минск 2021

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлен метод диагностики заболеваний и патологических состояний, обусловленных мутациями в генах *ADAMTSL4* и *CBS*, проявляющихся эктопией хрусталика, который может быть использован в комплексе мероприятий по оказанию медицинской помощи пациентам с врожденным смещением хрусталика и их семьям. Наследственные заболевания, обусловленные мутациями в генах *ADAMTSL4* и *CBS*, проявляющиеся эктопией хрусталика включают: изолированную аутосомно-рецессивную эктопию хрусталика, эктопию хрусталика и зрачка, ассоциированные с патогенными вариантами в гене *ADAMTSL4* (Q12.1) и классическую гомоцистинурию (E72.1), причиной которой являются мутации в гене *CBS*. Краткое описание этих заболеваний представлено в приложении 1 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 выполнения полимеразной цепной реакции (ПЦР).
3. Оборудование и реагенты для секвенирования по Сэнгеру.
4. Аппаратное и программное обеспечение для анализа и документирования полученных результатов.

Подробный перечень необходимого оборудования, реагентов и реактивов представлен в приложении 2 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 определения концентрации общего гомоцистеина — плазма крови с ЭДТА.

### **ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Врожденное смещение (эктопия) хрусталика.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### Диагностика наследственных заболеваний, обусловленных мутациями в генах *ADAMTSL4* и *CBS*, проявляющихся эктопией хрусталика

Этапы диагностики наследственных заболеваний, обусловленных мутациями в генах *ADAMTSL4* и *CBS*, проявляющихся эктопией хрусталика.

Определить концентрацию общего гомоцистеина в плазме крови:

концентрация общего гомоцистеина в плазме крови равна или превышает 100 мкмоль/л — диагноз классическая гомоцистинурия (Нарушения обмена серосодержащих аминокислот (МКБ-10: E72.1)), перейти к секвенированию гена *CBS* по Сэнгеру;

не все патогенные мутации в гене *CBS* можно выявить с помощью секвенирования по Сэнгеру. При наличии сочетания врожденного смещения хрусталика с тяжелой гипергомоцистенемией (концентрация общего гомоцистеина равна или превышает 100 мкмоль/л) диагноз классической гомоцистинурии следует считать установленным независимо от того, выявлены патогенные мутации в гене *CBS* или нет. Секвенирование гена *CBS* необходимо для того, чтобы установить генотип пациента и его родителей для определения возможности проведения и тактики пренатальной диагностики;

патогенные мутации в гене *CBS* выявлены — диагноз классической гомоцистинурии (Нарушения обмена серосодержащих аминокислот (МКБ-10: E72.1)) подтвержден, в данной семье возможно проведение пренатальной диагностики классической гомоцистинурии методом секвенирования по Сэнгеру;

патогенные мутации в гене *CBS* не выявлены — в данной семье проведение пренатальной диагностики методом секвенирования по Сэнгеру не представляется возможным;

концентрация общего гомоцистеина в плазме крови менее 100 мкмоль/л — перейти к поиску мутации с.767\_786del20 в гене *ADAMTSL4* методом фрагментного анализа;

при фрагментном анализе обнаружена мутация с.767\_786del20 в гене *ADAMTSL4* — диагноз изолированная аутосомно-рецессивная эктопия хрусталика/эктопия хрусталика и зрачка (Врожденное смещение хрусталика (МКБ-10: Q12.1));

при фрагментном анализе мутация с.767\_786del20 в гене *ADAMTSL4* не обнаружена — перейти к секвенированию гена *ADAMTSL4* по Сэнгеру;

патогенные мутации в гене *ADAMTSL4* выявлены — диагноз изолированная аутосомно-рецессивная эктопия хрусталика/эктопия хрусталика и зрачка (Врожденное смещение хрусталика (МКБ-10: Q12.1));

- патогенные мутации в гене *ADAMTSL4* не выявлены — диагноз врожденное смещение хрусталика (Врожденное смещение хрусталика (МКБ-10: Q12.1)).

### Протокол детекции мутации с.767\_786del20 в гене *ADAMTSL4*

Проведение амплификации

Для ПЦР использовать 50-100 нг ДНК.

Составить общую реакционную смесь: амплификационный буфер (1x), смесь дезоксирибонуклеотидов 0,2 мМ каждого, 2,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 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 таблице 1 приложения 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 таблице 1 приложения 3 в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 30 с. Конечная элонгация при 72 °С 10 мин.

Детекция продуктов амплификации

1. Электрофорез в полиакриламидном геле

1.1. Подготовить образцы для нанесения на гель. Для этого смешать 5 мкл образца, 1 мкл погружающего буфера, 1 мкл SYBR Green (1:10000).

1.2. Разделение фрагментов проводить с помощью электрофореза в 9–6 % (для фрагментов длиной 490 и 545 п.о.) полиакриламидном геле.

1.3. Визуализацию результатов осуществлять в проходящем ультрафиолетовом свете.

2. Капиллярный электрофорез

2.1. Приготовить образцы для нанесения на капилляр. Для этого смешать 1,0 мкл ПЦР-продукта, 0,5 мкл меченых стандартов молекулярных весов (1:2) и 8,5 мкл формамида (HiDi).

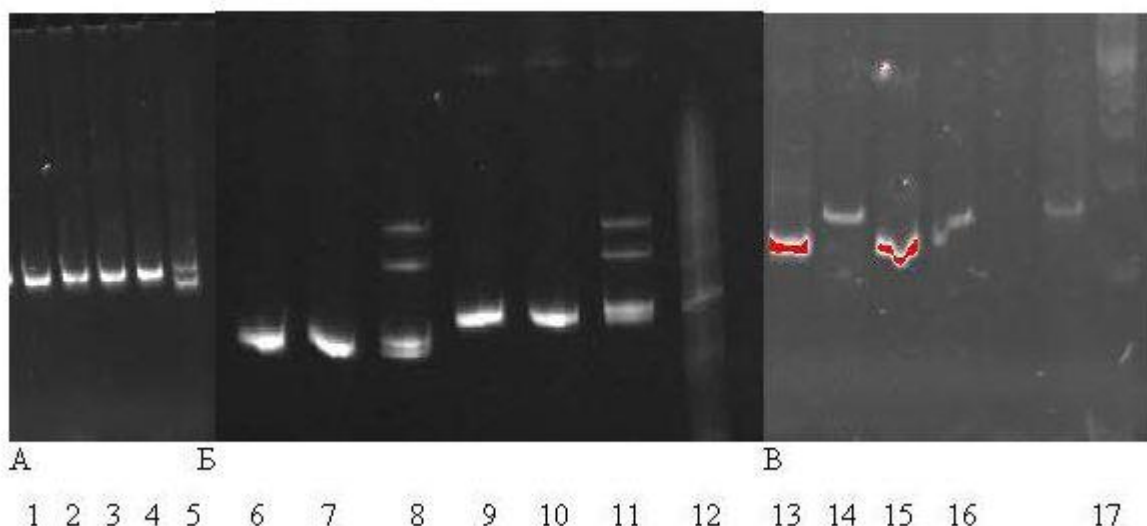
2.2. Проинкубировать смесь 5 мин при 95 °С.

2.3. Нанести смесь на прибор. Начальные параметры: напряжение при инъекции 1.6 kV, время инъекции 8 с, напряжение в процессе электрофореза 19,5 kV, время — 1330 с, полимер POP-7.

Интерпретация результатов

Электрофорез в полиакриламидном геле

В результате амплификации участка гена *ADAMTSL4*, содержащего мутацию c.767\_786del20 с использованием пар праймеров, указанных в таблице 1, образуются фрагменты длиной 223, 235, 490, 545 п.о. При наличии делеции в гомозиготном состоянии синтезируются фрагменты длиной 203, 215, 470 и 525 п.о. соответственно (рисунок 1). При наличии делеции в гетерозиготном состоянии на электрофореграмме визуализируются фрагменты соответствующие нормальному (223, 235, 490, 545 п.о) и мутантному (203, 215, 470 и 525 п.о.) аллелю. Кроме того, на электрофореграмме в этом случае присутствуют дополнительные сигналы, обусловленные образованием гетеродуплексов (рисунок 1).

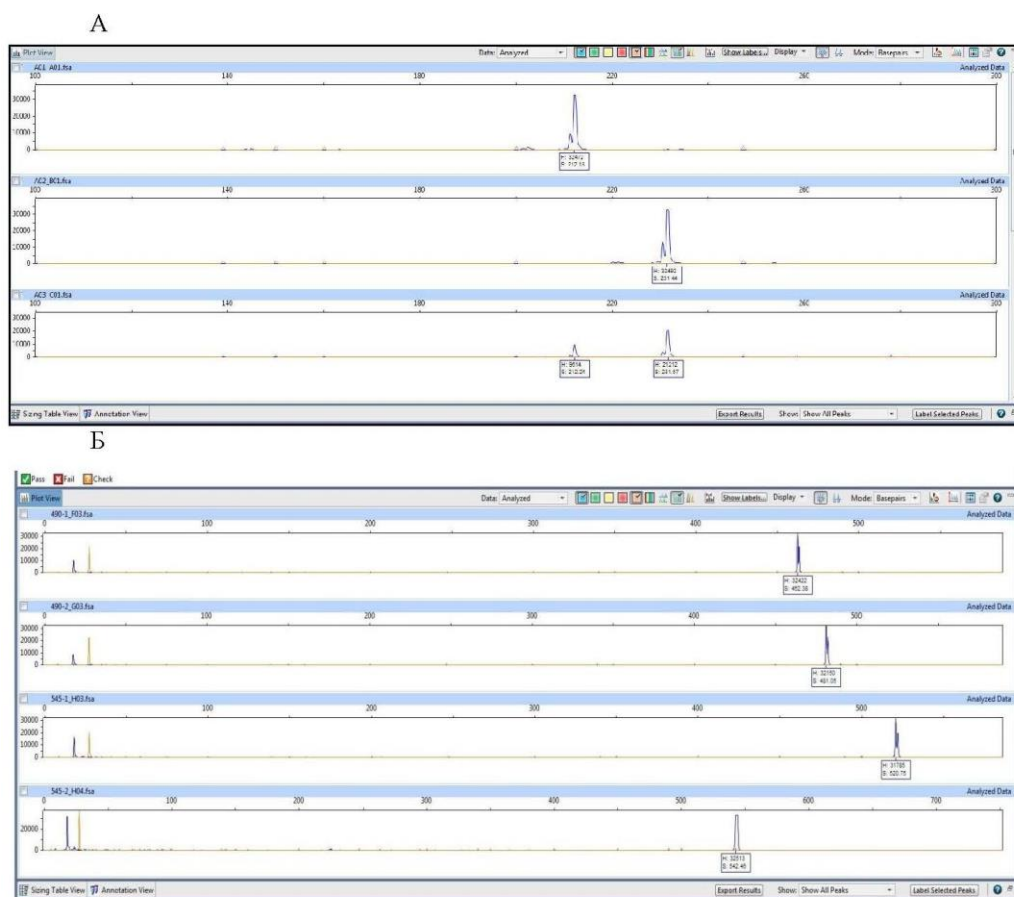


А – дорожки 1,2,3,4 – фрагмент 235 п.о., (мутация отсутствует), дорожка 5 – фрагменты 235 и 215 п.о. (мутация с.767\_786del20 в гетерозиготном состоянии),  
 Б – дорожки 6 и 9 фрагменты 490 и 545 п.о. (мутация отсутствует), дорожки 7 и 10 - фрагменты 470 и 525 п.о.(мутация с.767\_786del20 в гомозиготном состоянии), дорожки 8 и 11 – мутация с.767\_786del20 в гетерозиготном состоянии, 12 – маркер молекулярного веса 500 п.о. ;В – дорожки фрагменты 13 и 15 мутация с.767\_786del20 в гомозиготном состоянии, дорожки 14 и 16 – мутация отсутствует, 17 – маркер молекулярного веса 200 п.о.

**Рисунок 1. — Электрофорез участка гена *ADAMTSL4*, содержащего мутацию с.767\_786del20 в полиакриламидном геле**

#### Капиллярный электрофорез

При капиллярном электрофорезе в случае отсутствия мутации визуализируется пик 235, 490, 545 п.о., при наличии мутации в гомозиготном состоянии обнаруживаются фрагменты длиной 215, 470 и 525 п.о., при наличии мутации в гетерозиготном состоянии детектируются два сигнала соответствующие 235 и 215 п.о (490 и 470 п.о., 545 и 525 п.о.), что представлено на рисунке 2.



А — верхняя дорожка – фрагмент 215 п.о. (мутация с.767\_786del20 в гомозиготном состоянии), средняя дорожка – фрагмент 235 п.о. (мутация отсутствует), нижняя дорожка – фрагменты 235 и 215 п.о. (мутация с.767\_786del20 в гетерозиготном состоянии); Б — верхняя дорожка – фрагмент 470 п.о. (мутация с.767\_786del20 в гомозиготном состоянии), дорожка вторая сверху – фрагмент 490 п.о. (мутация отсутствует), дорожка третья сверху – фрагмент 525 п.о. (мутация с.767\_786del20 в гомозиготном состоянии), нижняя дорожка – фрагмент 545 п.о. (мутация отсутствует)

**Рисунок 2. — Капиллярный электрофорез участка гена ADAMTSL4, содержащего мутацию с.767\_786del20**

### **Протокол секвенирования генов ADAMTSL4, CBS**

#### **Проведение амплификации**

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 таблицах 2 и 3 приложения 3.

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

2 и 3 приложения 3 в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 30 с. Конечная элонгация при 72 °С 10 мин.

**Проведение терминирующей реакции**

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

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

Полученные в реакции секвенирования флуоресцентно меченые 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 наборы реагентов, то электрофорез следует проводить в соответствии с рекомендациями производителя реагентов.

**Особенности медико-генетического консультирования пациентов с заболеваниями и патологическими состояниями, обусловленными мутациями в генах *ADAMTSL4* и *CBS*, проявляющихся эктопией хрусталика, и членов их семей**

Заболеваниями и патологические состояния, обусловленные мутациями в генах *ADAMTSL4* и *CBS*, 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.



Приложение 1  
к инструкции по применению  
«Метод диагностики  
заболеваний  
и патологических состояний,  
обусловленных мутациями  
в генах *ADAMTSL4* и *CBS*,  
проявляющихся эктопией  
хрусталика»  
Справочное

Изолированная аутосомно-рецессивная эктопия хрусталика/эктопия  
хрусталика и зрачка

В МКБ-10 врожденное смещение хрусталика, ассоциированное с мутациями в гене *ADAMTSL4*, относят к классу Q12.1 «Врожденное смещение хрусталика». Характерными проявлениями заболеваний, обусловленных мутациями в гене *ADAMTSL4*, являются смещение хрусталика, которое обнаруживают обычно в раннем детском возрасте, реже при рождении, врожденные аномалии радужной оболочки, нарушения рефракции (миопия, гиперметропия, астигматизм), которые могут приводить к развитию амблиопии, раннее развитие катаракты. Повышение внутриглазного давления выявляют у 20–25 % пациентов, однако атрофию зрительного нерва, вследствие глаукомы регистрируют редко. У многих пациентов отмечено утолщение центральной части роговицы. В редких случаях описывают отслоение сетчатки. Степень выраженности клинических проявлений может существенно варьировать не только у членов одной семьи, но и относительно разных глаз одного пациента. Симптомов поражения других органов и систем обычно не наблюдается, однако, у нескольких пациентов были отмечены изменения со стороны скелета: краниосиностозы, плоскостопие, килевидная деформация грудной клетки, сколиоз, гипермобильность суставов.

Формальные диагностические критерии патологии, обусловленной мутациями в гене *ADAMTSL4*, не определены. Наличие мутаций в этом гене можно предполагать в случае наличия у пациента следующих признаков:

1. Умеренное или выраженное смещение в любом направлении хрусталиков не связанное с травмой. Сферофакия, колобома хрусталика, иридодонез.

2. Умеренное или выраженное смещение значка. При смещении зрачка дислокация хрусталика обычно происходит в противоположном направлении.

3. Увеличение отростков радужной оболочки, что ведет аномалиям иридокорнеального угла.

4. Глубокая передняя камера, тонкая плоская радужная оболочка с потерей крипт в сочетании с депигментацией радужной оболочки; обычно наблюдается у пациентов со значительным смещением значка.

5. Фиброз радужной оболочки вокруг зрачка, что приводит к нарушению расширения зрачка при введении мидриатиков.

6. Наличие зрачковой мембраны, которая представляет собой тяжи, идущие от края зрачка. Обычно визуализируется после расширения зрачка, а также с помощью ультразвуковой биомикроскопии.

7. Аутосомно-рецессивный тип наследования заболевания.

Наиболее распространенной мутацией гена *ADAMTSL4* у жителей европейских стран является делеция 20 оснований в 6 экзоне гена — c.767\_786del20, которая выявляется у 60 % пациентов с изолированным смещением хрусталика.

Классическая гомоцистинурия

Классическая гомоцистинурия — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене цистатионин β-синтазы (*CBS*). В МКБ-10 эту патологию относят к классу E72.1 «Нарушения обмена серосодержащих аминокислот». Клинические проявления классической гомоцистинурии включают врожденное смещение хрусталика и/или миопию тяжелой степени, тромбозы артериальных и венозных сосудов, задержку развития/умственную отсталость, судороги, психические нарушения, изменения со стороны скелета. Могут наблюдаться, гипопигментация кожи и волос, эритема в области носа и щек, напоминающая «волчаночную бабочку», livedo reticularis, панкреатит. Первым и основным тестом для диагностики этого заболевания является определение концентрации общего гомоцистеина в плазме крови. В норме содержание общего гомоцистеина в плазме крови составляет 5–10 у детей и 5–15 мкмоль/л — у взрослых. У пациентов с классической гомоцистинурией уровень общего гомоцистеина обычно превышает 100 мкмоль/л. Дополнительными диагностическими признаками являются повышение концентрации метионина и снижение содержания цистеина в плазме крови. Диагноз необходимо верифицировать с помощью определения активности цистатионин-β-синтазы или идентификации мутаций в гене *CBS*. Лечение классической гомоцистинурии направлено на снижение концентрации общего гомоцистеина до уровня максимально близкого к нормальному. Терапия классической гомоцистинурии включает диету с ограничением поступления метионина и препараты, снижающие концентрацию гомоцистеина за счет оптимизации его метаболизма: пиридоксин, бетаин, цианокобаламин, фолиевую кислоту.

Приложение 2  
к инструкции по применению  
«Метод диагностики заболеваний  
и патологических состояний,  
обусловленных мутациями  
в генах ADAMTSL4 и CBS,  
проявляющихся эктопией  
хрусталика»

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

Оборудование:

1. Воздушный термостат с температурой 56 °С.
2. Центрифуга, 12000 g.

Реагенты и реактивы:

1. Протеиназа К.
2. Лаурилсульфат натрия.
3. Натрия хлорид.
4. Натрия ацетат.
5. Этанол.
6. Трис.
7. ЭДТА.

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

Оборудование:

Амплификатор.

Реагенты:

1. Праймеры.
2. Буфер для ПЦР.
3. Магния хлорид.
4. Комплект дезоксирибонуклеотидов.
5. Таq-полимераза (или аналог).

**Оборудование и реагенты для секвенирования по Сенгеру**

Оборудование:

Генетический анализатор.

Реагенты:

1. Праймеры.
2. Набор BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit «Applied Biosystems» или аналог.
3. Этанол.
4. Ацетат натрия.
5. Трис.
6. 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.

Приложение 3  
к инструкции по применению  
«Метод диагностики заболеваний  
и патологических состояний,  
обусловленных мутациями  
в генах *ADAMTSL4* и *CBS*,  
проявляющихся эктопией  
хрусталика»

Таблица 1. — Нуклеотидная последовательность праймеров и условия ПЦР для амплификации фрагментов 6 экзона гена *ADAMTSL4*, содержащего мутацию с.767\_786del20

Экзон	Последовательность	Т отжига (°C)	Концентрация MgCl <sub>2</sub>	Длина ПЦР продукта (п.о.)
1	(F) - TCCCCTACTCCAAGAGCAGA (R) - CTCACCCACGCACTCCTTAG	60	2 mM	223
2	(F) - AGAGGCTATTCGGTCCCCTA - Fam (R) - CTCACCCACGCACTCCTTAG	60	2 mM	235
3	(F) - CTGTCTGTCCACACCCCATC-Fam (R) - CGAGGAGACTCACCGCTTG	60	2 mM	490
4	(F) - CCAAGCAGAACCTCTAAGCCC - Fam (R) - CAGGTGCCAAGCGGAAG	60	2 mM	545

Таблица 2. — Нуклеотидная последовательность праймеров и условия ПЦР для амплификации экзонов гена *ADAMTSL4*

Экзон	Последовательность	Т отжига (°C)	Концентрация MgCl <sub>2</sub>	Длина ПЦР продукта (п.о.)
1	2	3	4	5
1-2	(F) - GAGGTTGCCTGGAGAGAGC (R) - CACCCCAACAGGTGTCTTTC	61	1,5 mM	534
3-4	(F) - CCAGATGCCTGCGTAGTTTT (R) - GGAGATGAAAGGGTGGCA	61	1,5 mM	433
5	(F) - TTGGTCTACATGGACACTCTGG (R) - CTCCTTTCCTTCATGCTA	61	1,5 mM	495
6A	(F) - TCAGAGGGCTTGTCTTTGGT (R) - ACCGAAGGAAAAGGATCAGG	61	1,5 mM	574
6B	(F) - CTACGGCATCACCCAGAG (R) - TGCCCTGAGGTGGTCAGAT	61	1,5 mM	515
7	(F) - TTGGCATCTGACCACCTCA (R) - ATGAAGCGGATGGTAACCTG	61	1,5 mM	626
8	(F) - GAATGATGCACCCACCTC (R) - GTATGCATATGGGGGCATGT	64	1,5 mM	415
9	(F) - GGCACAAAAAGCAGGGTAGT (R) - CCCTCTCAGCTTCCTCACTC	61	1,5 mM	451

1	2	3	4	5
10	(F) - CTCGTGGAAGGAGTGAGGAA (R) - TGGGTTTTCTCCTGAAAGA	61	1,5 mM	484
11	(F) - CTGTGGTTGTCAAGATGGGA (R) - ATGCAGAGTGTCCTCCTCGT	61	1,5 mM	460
12	(F) - TTCACCTCCTCCAATCCTTG (R) - TAGAGCCCAAGCTCAGTGGT	61	1,5 mM	468
13	(F) - GAGACATCACAGTGC GTTCC (R) - TTTCTTGCTGCCTACCGAAT	61	1,5 mM	442
14	(F) - CAGCCCCACACATCTCATC (R) - GTTGTTACCTGTGCCCAT	61	1,5 mM	319
15	(F) - CCACGAAGCCATGTGACTG (R) - GCCCCTCATGGAAGTTGTT	61	1,5 mM	462
16	(F) - AAGTGAGAACA ACTTCCATGAGG (R) - CGTCCCCAGTTTGGATACAC	61	1,5 mM	568
17	(F) - CACTTGGGGTGCTCTCTGTC (R) - GCTTGGCTGGGCTTATTCT	61	1,5 mM	355
18	(F) - CCAAGCGTTACCACTGTCCT (R) - TCCCACTGGTCCTTTCTCAT	61	1,5 mM	408
19	(F) - CTCTCCCAATCCCAATAC (R) - AGTCCCAAAAGCACACCTGA	61	1,5 mM	509

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

Экзон	Последовательность	Т отжига (°C)	Концентрация MgCl <sub>2</sub>	Длина ПЦР продукта (п.о.)
1	(F) - CTCTCTCCTTGCTTTGCCAG (R) - CTGAGCATCCACTGTCTTGC	59	1,5 mM	469
2	(F) - ATGTGTGTTTCAGGCGTG (R) - GCCACTCATTAACCAGCGAG	59	1,5 mM	453
3	(F) - GGGGAGAAGCTCTGATAGGC (R) - CCGAATGCTGGTCAAAGGAA	59	1,5 mM	516
4-6	(F) - CCATGTTGGGCAATTTTGGA (R) - AGCATTTACAGAGGGAACA	59	1,5 mM	772
7	(F) - CTTTCACAGACCAAGGGCAG (R) - TCTTCCCAAACACCTCCCAG	65	1,5 mM	400
8	(F) - TTGGGTTTCTCATCCTGCCT (R) - GACCTTCGAGACCAGCTTCT	59	1,5 mM	448
9	(F) - CTGTCTGCAAAACGTGTTGG (R) - CGCAGTGACACTCCTCAGAA	59	1,5 mM	400
10	(F) - GCACAAGGAAGAAGCCGATG (R) - GTGAGAGGCATCCAGGGAAG	59	1,5 mM	366
11-12	(F) - GCATGCTCACACACGCTT (R) - TGCCCTGAACGTCTGTATGA	59	1,5 mM	819
13	(F) - CGAGGACATGTCTGACAGCA (R) - GAGTACTCTGGCACCCCTCTG	65	1,5 mM	975
14	(F) - CTGCCCAAACCTAGGAGTGA (R) - ACTGGGTGTCACTGAAGGTC	59	1,5 mM	432
15	(F) - GGAGTCTGAGGCACGAGAAT (R) - GAAAGCGAAGGAGAAGTGGG	59	1,5 mM	432