

УДК 577.213.3

## НОВІ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ МУТАЦІЙ У ДЕЯКИХ ЕКЗОНАХ ГЕНІВ *PAH* ТА *CFTR* ЛЮДИНИ З ВИКОРИСТАННЯМ ДЕНАТУРУЮЧОГО ГРАДІЄНТНОГО ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

О. О. Соловійов

Д. О. Голомідов

Л. А. Лівшиць

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Розроблено діагностичні методики для детекції мутантних варіантів деяких екзонів генів *PAH* (фенілкетонурія) та *CFTR* (муковісцидоз) методом денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE). Показано високу ефективність методу для використання у програмах скринінгу цих тяжких спадкових захворювань серед населення України.

**Ключові слова:** DGGE, ген, мутації, ДНК-діагностика, фенілкетонурія, муковісцидоз.

Генетичне тестування муковісцидозу (МВ, *CFTR*) і фенілкетонурії (ФКУ, *PAH*) є актуальною проблемою медичної генетики. В Україні на 8 300 новонароджених одна дитина хвора на ФКУ. Частота носіїв мутантного гена *PAH* серед населення України становить 1:43 [1]. На 2006 рік кількість ідентифікованих мутацій гена *PAH* досягла 513. В Україні й у багатьох країнах Європи аналіз мажорної мутації R408W [2], локалізованої в 12-му екзоні, є вкрай важливим для молекулярно-генетичної діагностики. Також дуже актуальним є аналіз мутацій 7-го ексона гена *PAH*, оскільки в ньому ідентифіковано близько 90 мутацій.

Частота захворювання на муковісцидоз у різних популяціях суттєво варіює і становить у середньому 1:2–2,5 тис. новонароджених серед представників білої раси та 1:9–10 тис. новонароджених серед представників африканської раси (Goodchild, Dodge, 1987). Виходячи із цих показників гетерозиготними носіями патологічного гена є близько 5% населення світу. В Україні частота МВ становила 1:2200 [3].

З огляду на це збільшується потреба в розробленні ефективних методик для масового та селективного скринінгу хворих і гетерозиготних носіїв мутантних алелів, що спричиняють дані захворювання.

Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (DGGE) вважається одним із найефективніших сучасних методів для детекції мутацій. Метод DGGE був розроблений

С. Фішером і Л. Лерманом [4,5]. Він ґрунтується на розділенні дволанцюгових фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу в стандартному акриламідному гелі з лінійним градієнтом денатуруючих факторів – сечовини, формаміду або температури. Під час електрофорезу дволанцюгових ДНК у гелі з лінійно зростаючим градієнтом концентрацій денатуруючих агентів плавлення ланцюгів ДНК відбувається у строго специфічній для даної послідовності ділянці, при еквівалентній температурі плавлення. У результаті відбувається поділ фрагментів ДНК, що розрізняються за нуклеотидним складом.

Метою роботи було розробити діагностичні методики детекції мутантних варіантів 7-го та 12-го екзонів гена *PAH* та 20-го ексона гена *CFTR* методом DGGE.

### Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугували зразки периферичної крові хворих із різних регіонів України. Виділення та очищення ДНК зі зразків проводили шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К з наступною фенольною екстракцією [6]. Для проведення ампліфікації *in vitro* послідовностей 7-го і 12-го екзонів гена *PAH* та 20-го ексона гена *CFTR* нами було розроблено дизайн олігонуклеотидних праймерів. Аналіз послідовності праймерів на специфічність виконували з використанням комп'ютерної бази даних BLAST SEARCH

за умов сканування геномної послідовності ДНК генів *PAH* і *CFTR*. Для оптимізації роздільної здатності методу DGGE до 5'- або 3'-кінця одного з пари праймерів приєднували GC-багатий фрагмент (GC-clamp). Позицію для приєднання GC-фрагмента визначали за допомогою комп'ютерного алгоритму Melt 87 [7, 8]. Аналіз термодинамічних параметрів праймерів здійснювали за програмою Vector NTI Suite 6.

Праймери були синтезовані твердофазним фосфоамідитним методом на олігосинтезаторі Biosset (Росія).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в автоматичному режимі на термоциклері Perkin Elmer (Cetus) за таких умов:

– 20-й екзон гена *CFTR*: ініціувальна денатурація — при 94 °С протягом 5 хв; 39 циклів: денатурація — 1хв, 94 °С, відпалювання праймерів — 1хв, 55 °С, елонгація — 1хв, 72 °С; фінальна елонгація при 72 °С протягом 3 хв; формування гетеродуплексів: денатурація при 94 °С упродовж 5 хв з наступним відпалюванням при температурі 55 °С та швидко охолодження;

– 7-й екзон гена *PAH*: рге PCR : денатурація при 94 °С — 4 хв, відпалювання праймерів — 59 °С, 2 хв, елонгація — 72 °С, 2 хв; 5 циклів: денатурація ДНК — 45 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с, 58 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; 5 циклів: денатурація ДНК — 45 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с, 56 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; 25 циклів: денатурація ДНК — 45 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с, 55 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; фінальна елонгація: 72 °С — 3 хв;

– 12-й екзон гена *PAH*: ініціувальна денатурація — 3 хв, 94 °С; 5 циклів: денатурація ДНК — 45 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с, 53 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; 28 циклів: денатурація ДНК — 30 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 30 с, 51 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; фінальна елонгація: 72 °С — 2 хв.

Робоча суміш об'ємом 25 мкл містила: Tris-HCl — 67 мМ (рН 8,8, 25 °С); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 16,7 мМ; ЕДТА — 6,7 мкМ; MgCl<sub>2</sub> — 2,5–4 мМ; бичачий сироватковий альбумін — 170 мкг/мл; dNTP — 400 мкМ кожного типу; праймери — 4,5 рмол/мл; ДНК — 1 мкг; Taq-полімераза — 0,5 од. активності на пробу.

Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (DGGE) проводили з використанням методик [9,10] за такими параметрами:

– 20-й екзон гена *CFTR*: 7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 10–60%

сечовини з формамідом, температура 55 °С, постійна напруга 240В, тривалість — 5 год;

– 7-й та 12-й екзони гена *PAH*: 7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 25–55% сечовини з формамідом, температура 60 °С, постійна напруга 180В, тривалість — 3 год.

Забарвлення гелів після DGGE здійснювали водним розчином броміду етидію та барвником Varva NA, синтезованим у відділі комбінаторної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Для проведення рестрикційного аналізу продуктів ПЛР у зразки додавали 1 од.активності відповідної ендонуклеази рестрикції, 1 мкл специфічного для рестриктази стандартного буфера та інкубували при температурі 55 °С упродовж 2 год або при температурі 37 °С 12 год. Продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 10%-му поліакриламідному гелі (співвідношення акриламід:бісакриламід — 29:1). Як маркери молекулярної маси використовували 100 Base-Pair Ladder.

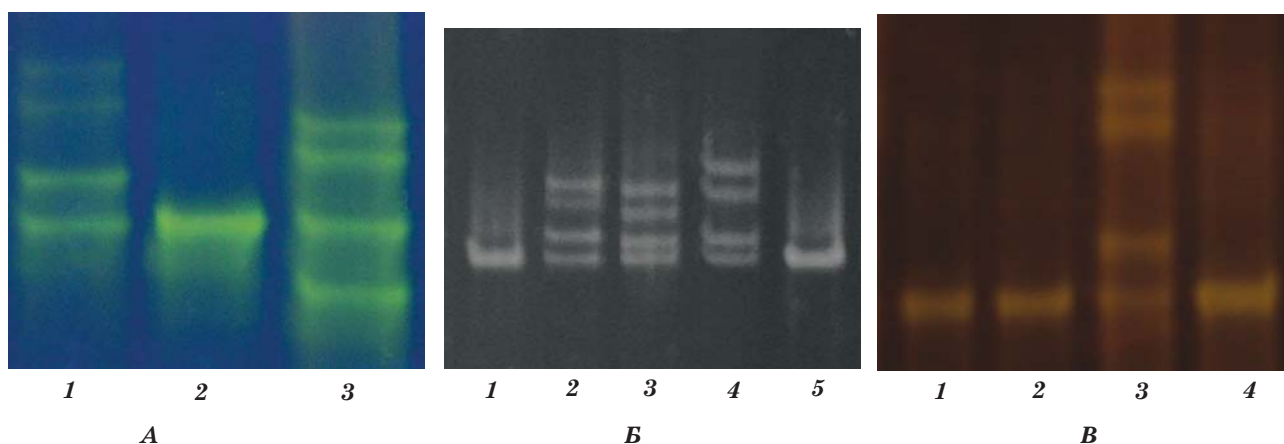
Візуалізацію гелів після фарбування проводили, застосовуючи УФ-трансліюмінатор (λ = 290 нм) та прилад Dark Reader, Clare Chemical Research, США (λ = 470 нм).

## Результати та обговорення

Під час проведення DGGE 12-го та 7-го екзонів гена *PAH* і 20-го ексона гена *CFTR* зразками слугували ДНК носіїв мутацій R408W, Y414C (12-й екзон гена *PAH*), P281L, R252W, R261Q (7-й екзон гена *PAH*), W1282X (20-й екзон гена *CFTR*) із колекції відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Результати експерименту наведено на рис. 1. У разі присутності мутації R408W та Y414C у гетерозиготному стані DGGE-профіль представлений двома гомодуплексами та двома гетеродуплексами, присутність яких збільшує інформативність розділення (рис. 1, А). На рис.1, Б зображено DGGE-профіль мутацій P281L, R252W, R261Q у гетерозиготному стані. DGGE-профіль мутації W1282X у гетерозиготному стані подано на рис. 1, В.

З використанням розроблених методів аналізу мутацій 7-го і 12-го екзонів гена *PAH* та 20-го ексона гена *CFTR* нами було проведено пілотний скринінг цих послідовностей у групі дітей, хворих на фенілкетонурію і муковісцидоз, та їхніх батьків, кров яких надходила з усіх регіонів України. Методом



**Рис. 1. DGGE-електрофореграми послідовностей 12-го екзона гена *PAH*, 7-го екзона гена *PAH* та 20-го екзона гена *CFTR*:**

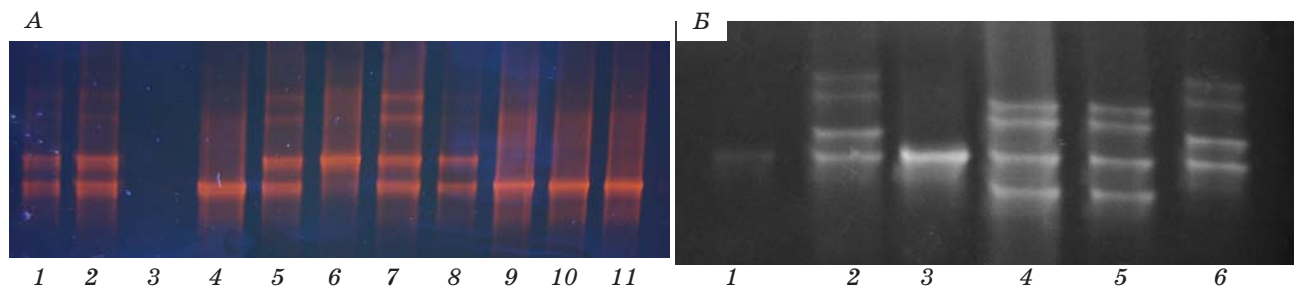
**A** — DGGE-електрофореграма мутацій 12-го екзона гена *PAH* (7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 25–60%): 1 — R408W/норма; 2 — норма/норма; 3 — Y414C / норма;  
**B** — DGGE-електрофореграма мутацій 7-го екзона гена *PAH* (7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 25–60%): 1 — норма/норма; 2 — P281L/норма; 3 — R252W/норма; 4 — R261Q/ норма; 5 — норма/норма;  
**B** — DGGE-електрофореграма послідовностей 20-го екзона гена *CFTR* (7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 10–60%, температура 55°C, напруга 230 В, тривалість 5 год): 1, 2, 4 — норма/норма, 3 — W1282X/норма

DGGE було досліджено 35 пацієнтів на фенілкетонурію та 25 пацієнтів — на муковісцидоз.

Під час аналізу електрофореграм 12-го екзона гена *PAH* виявлено 12 гетерозиготних носіїв мутації R408W та один носій цієї мутації у гомозиготному стані, 2 гетерозиготних носії мутації Y414C (рис. 2, А, В). Ці результати підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу продуктів ПЛР із застосуванням ендонуклеаз рестрикції *MnII*, *RsaI*, відповідно [1,2].

У результаті аналізу 7-го екзона гена *PAH* методом денатуруючого градієнтного гелелектрофорезу було одержано DGGE-профілі

пацієнтів та контрольних зразків ДНК з мутаціями (електрофореграму наведено на рис. 3); виявлено 5 гетерозиготних носіїв мутації P281L, 3 носії R252W та 2 носії R261Q. Ці результати підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу продуктів ПЛР ендонуклеазами рестрикції *MspI*, *Eco88I*, *HinfI*, відповідно [1, 2]. Було також виявлено 3 мутантні варіанти 7-го екзона гена *PAH* (рис. 3), які не вдалося ідентифікувати за допомогою рестрикційного аналізу. Планується проведення прямого секвенування послідовностей 7-го екзона з метою визначення знайденої мутації.



**Рис. 2. DGGE-електрофореграма послідовностей 12-го екзона гена *PAH* хворих на фенілкетонурію та членів їхніх родин:**

**A** — Сім'я I: 1 — мати — носій мутації R408W у гетерозиготному стані; 2 — пробанд — носій мутації R408W у гетерозиготному стані; 3 — негативний контроль ампліфікації; 4 — здоровий індивід; 5 — маркер мутації R408W у гетерозиготному стані. Сім'я II: 5 — пробанд — носій мутації R408W у гомозиготному стані; 6, 7 — мати та батько — носії мутації R408W у гетерозиготному стані; 8, 9, 10 — здорові індивіди;  
**B** — 1 — негативний контроль; 2 — носій мутації R408W у гетерозиготному стані; 3 — здоровий індивід; 4 — носій мутації Y414C у гетерозиготному стані; 5 — позитивний контроль на мутацію Y414C; 6 — позитивний контроль на мутацію R408W

Дослідивши 25 хворих на муковісцидоз пацієнтів методом DGGE, ми виявили трьох гетерозиготних носіїв мутації W1282X (рис. 4). Одержані результати підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу продуктів ПЛР ендонуклеазами рестрикції MnlI [11].

Таким чином, нами було розроблено діагностичні методики детекції мутацій 7-го

і 12-го екзона гена *PAH* та 20-го екзона гена *CFTR* за допомогою методу денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE).

Ці робочі методики можуть бути використані в тест-системах для ДНК-аналізу у програмах селективного та масового скринінгу з метою профілактики муковісцидозу та фенілкетонурії в Україні.

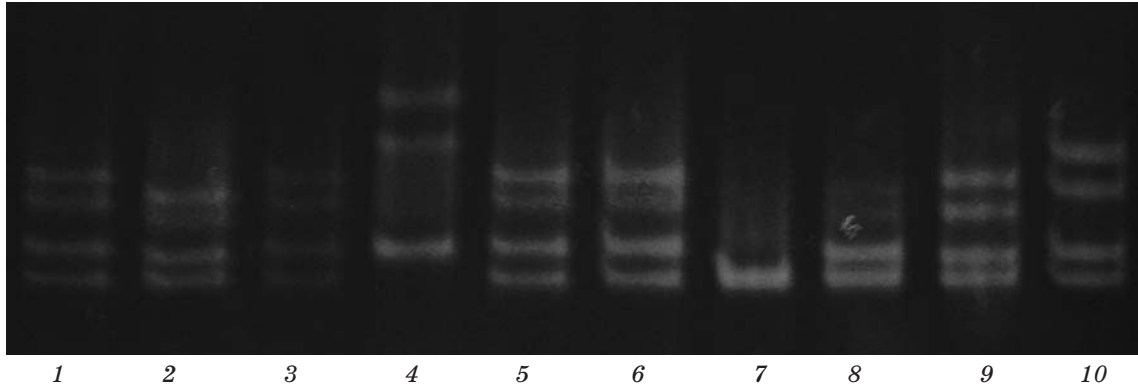


Рис. 3. DGGE-електрофореграма послідовностей 7-го екзона гена *PAH* хворих на фенілкетонурію та членів їхніх родин:

- |  |  |
|--|--|
| 1 — позитивний контроль на мутацію P281L;        | 6 — носій мутації P281L у гетерозиготному стані; |
| 2 — неідентифікований мутантний варіант;         | 7 — здоровий індивід;                            |
| 3 — носій мутації P281L у гетерозиготному стані; | 8 — неідентифікований мутантний варіант;         |
| 4 — неідентифікований мутантний варіант;         | 9 — позитивний контроль на мутацію R252W;        |
| 5 — носій мутації P281L у гетерозиготному стані; | 10 — позитивний контроль на мутацію R261Q        |

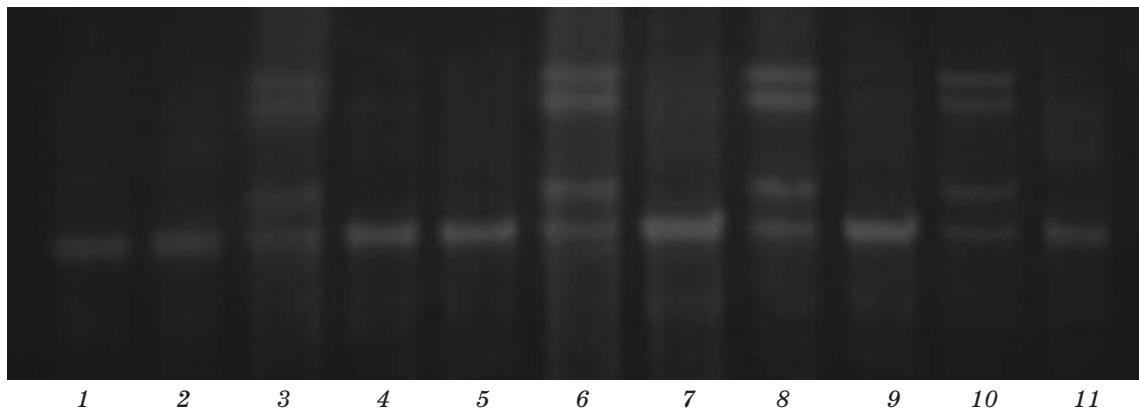


Рис. 4. DGGE - електрофореграма послідовностей 20-го екзона гена *CFTR* хворих на муковісцидоз та членів їхніх родин на носійство мутації W1282X 20-го екзона гена *CFTR*:

- |  |   |
|--|---|
| 1 — негативний контроль;                   | 4, 5, 7, 9, 11 — здорові індивіди;                      |
| 2 — здоровий індивід;                      | 6, 8, 10 — носій мутації W1282X у гетерозиготному стані |
| 3 — позитивний контроль на мутацію W1282X; |   |

## ЛІТЕРАТУРА

1. Нечипоренко М. В., Кравченко С. А., Лившиць Л. А. Аналіз мутацій та VNTR-поліморфізму гена фенілаланінгідроксилази // Укр. біохім. журн. — 2001. — Т. 73, №2. — С. 63–67.
2. Нечипоренко М. В., Лившиць Л. А. Аналіз мутацій гена фенілаланінгідроксилази в семьях високого ризику фенілкетонурии в Україні // Цитология и генетика. — 2000. — Т. 34, №6. — С. 59–63.
3. Резник Б. Я., Бабий И. Л., Лившиць Л. А. Муковисцидоз у дітей і підлітків. — К.: Здоров'я, 1994. — 144 с.
4. Fischer S. G., Lerman L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory // Proc. Nat Acad. Sci. USA. — 1983. — V. 80. — P. 1579–1583.
5. Fischer S. G., Lerman L. S. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences // Ibid. — 1980. — V. 77, N 8. — P. 4420–4424.
6. Маниатис Т., Фрич Е. Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1985. — 420 с.
7. Myers R. M., Fischer S. G., Maniatis T. et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis // Nuc. Acid. Res. — 1985. — V. 13, N9. — P. 3131–3145.
8. Lerman L. S., Silverstein K. Computational simulation of DNA melting and its application to DGGE // Meth. Enzymol. — V. 155. — P. 482–501.
9. Guldborg P., Guttler F. A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis // Nucl. Acid. Res. — 1993. — V. 21, N9. — P. 2261–2262.
10. Fanen P., Ghanem N., Vidaud M. et al. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions // Genomics. — 1992. — V. 13, N 3. — P. 770–776.
11. Kadasi L., Polakova H., Zatkova A. et al. / INCO-BIOMED Workshop for Central and Eastern European Countries «DNA extraction and Cystic Fibrosis Mutation Detection Techniques», Prague, September 13–16, 1997. — P. 15–17.

**НОВЫЕ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА  
МУТАЦИЙ В НЕКОТОРЫХ ЭКЗОНАХ  
ГЕНОВ PAH И CFTR ЧЕЛОВЕКА  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ДЕНАТУРИРУЮЩЕГО  
ГРАДИЕНТНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА**

А. А. Соловьев  
Д. А. Голомидов  
Л. А. Лившиць

Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Разработаны диагностические методики для детекции мутантных вариантов некоторых экзонов генов PAH (фенилкетонурия) и CFTR (муковисцидоз) методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE). Показана высокая эффективность метода для применения в программах скрининга этих тяжелых наследственных заболеваний среди населения Украины.

**Ключевые слова:** DGGE, ген, мутации, ДНК-диагностика, фенилкетонурия, муковисцидоз.

**NEW TECHNIQUES FOR MUTATION  
ANALYSIS IN SOME EXONS OF PAH  
AND CFTR GENE OF MEN USING DENA-  
TURING GRADIENT  
GEL-ELECTROPHORESIS**

O. O. Solovyov  
D. O. Golomidov  
L. A. Livshyts

Institute of Molecular Biology and Genetics  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Diagnostic methods for mutant variants detection of some exons in PAH gene (phenylketonuria) and CFTR gene (cystic fibrosis) using denaturing gradient gel-electrophoresis (DGGE) were developed. High effectiveness method for the application in the screening programs of these severe hereditary diseases among the population of Ukraine was shown.

**Key words:** DGGE, gene, mutations, DNA diagnostics, phenylketonuria, cystic fibrosis.