

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ  
Национальный технический университет Украины  
Факультет биотехнологии и биотехники;

Институт молекулярной биологии и генетики НАН  
Украины, Киев  
Отдел геномики человека

Использование методов ДНК-анализа для  
диагностики моногенных наследственных  
заболеваний

Островной Денис Владимирович

# Фенилкетонурия

- Одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний является фенилкетонурия
- В Украине на 8300 новорожденных один ребенок рождается больной ФКУ

Фенилаланингидроксилаза катализирует  
реакцию преобразования

фенилаланин + O<sub>2</sub> + тетрагидробиоптерин



тирозин + вода + окисленный биоптерин

# Цель работы

Провести ДНК-анализ мутаций и полиморфизма гена ФАГ и оптимизировать технологию проведения полимеразной цепной реакции для амплификации *in vitro* последовательности ДНК седьмого экзона этого гена.

Для достижения цели были поставлены основные задачи исследования:

- ДНК-анализ мутаций R408W, R158Q, Y414C, IVS10nt546, IVS12nt1 гена ФАГ
- ДНК-анализ мутаций в последовательности 7-го экзона гена ФАГ
- Анализ алельного полиморфизма VNTR-локуса 3`-нетранслированной области гена ФАГ

# Объект и предмет исследования

- Объект исследования - ДНК человека полученная из лейкоцитов периферической крови
- Предмет исследования – анализ мутаций в 5, 7, 12 экзоне и 10, 12 интроне гена ФАГ

# Методы:

- Выделение и очистка ДНК;
- амплификация *in vitro* последовательностей гена ФАГ методом полимеразной цепной реакции;
- рестрикционный анализ ПЦР-продуктов;
- гель-электрофорез

# Этапы ДНК-анализа:

1. Выделение геномной ДНК из образцов венозной крови методом фенольной экстракции;
2. Амплификация *in vitro* фрагмента ДНК с помощью полимеразной цепной реакции;
3. Гидролиз ПЦР-продуктов при помощи эндонуклеаз рестрикции;
4. Гель-электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле.



# Схема рестрикционного анализа для детекции мутаций R408W эндонуклеазой рестрикции Eco1301

Сайт узнавания Eco1301  $CC \begin{matrix} AA \\ TT \end{matrix} GG$

Фрагмент "нормальной" последовательности

```

-A-T-A-C-C-T-C-G-G-C-C-C
  | | | | | | | | | |
-T-A-T-G-G-A-G-C-C-G-G-G
  
```



```

-A-T-A-C-C-T-C-G-G-C-C-C
  | | | | | | | | | |
-T-A-T-G-G-A-G-C-C-G-G-G
  
```

245 п. н.

Фрагмент последовательности с мутацией

Eco1301

```

-A-T-A-C-C-T-T-G-G-C-C-C
  | | | | | | | | | |
-T-A-T-G-G-A-A-C-C-G-G-G
  
```

Сайт узнавания Eco1301

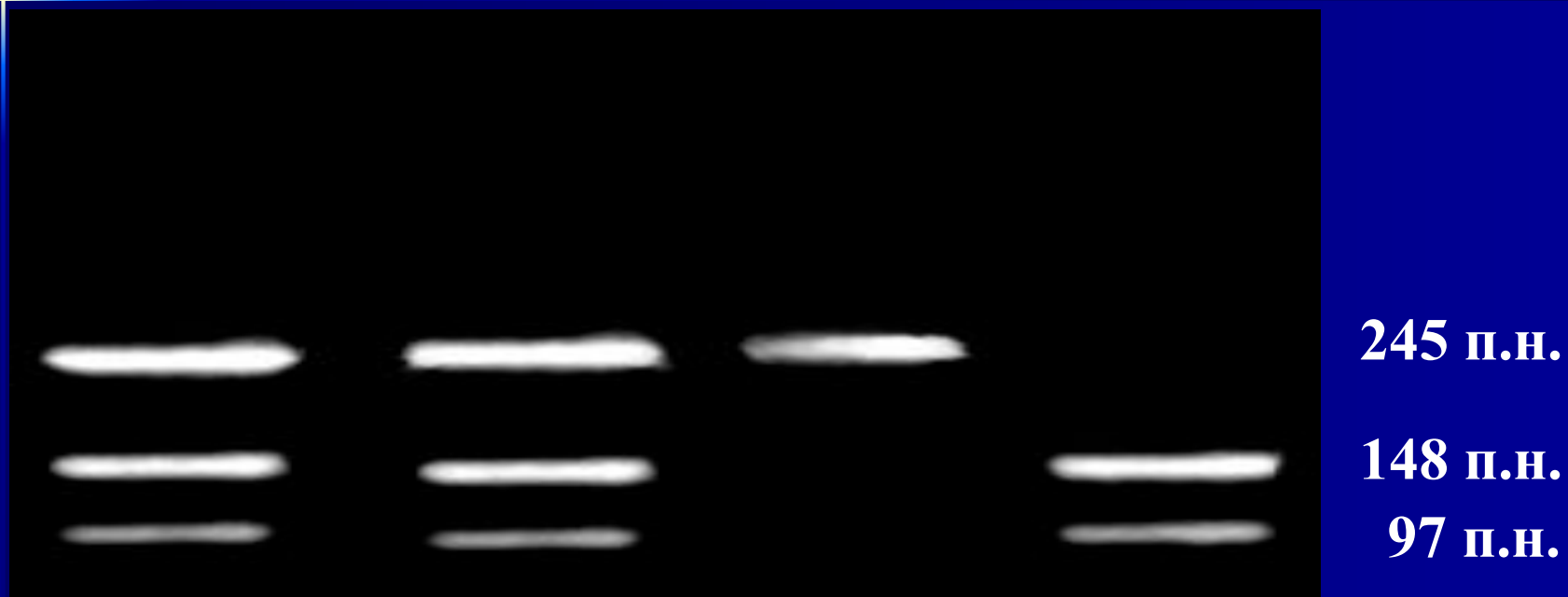


```

-A-T-A-C      C-T-T-G-G-C-C-C
  | | | | | | | | | |
-T-A-T-G-G-A-A-C      C-G-G-G
  
```

97 п. н.                      148 п. н.

# Анализ мутации R408W.



1                                      2                                      3                                      4

1, 2 – R408W/норма, 3 – норма/норма,

4 – R408/R408W.

# Схема рестриционного анализа для детекции мутаций R158Q эндонуклеазой рестрикции MspI

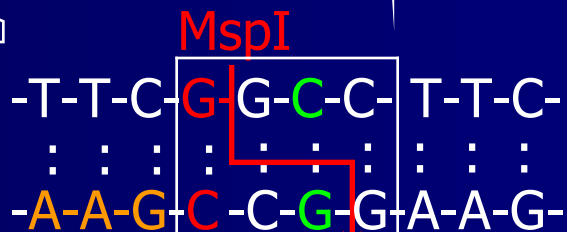
Фрагмент "нормальной" последовательности

3' -T-T-C-T-G-C-C-T-T-C-5'

3' -T-T-C-T-G-C-C-T-T-C-5'

5' -A-A-G-C-3'

Сайт узнавания MspI



-A-A-G-C-C-G    G-A-A-G-

-T-T-C-G    G-C-C-T-T-C-

123 п. н.

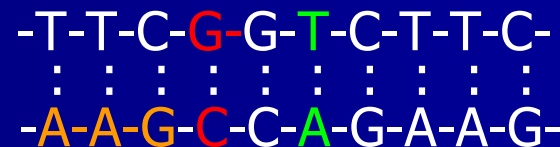
19 п. н.

Фрагмент последовательности с мутацией R158Q

-T-T-C-T-G-T-C-T-T-C-

3' -T-T-C-T-G-T-C-T-T-C-5'

5' -A-A-G-C-3'



-A-A-G-C-C-A-G-A-A-G-

-T-T-C-G-G-T-C-T-T-C-

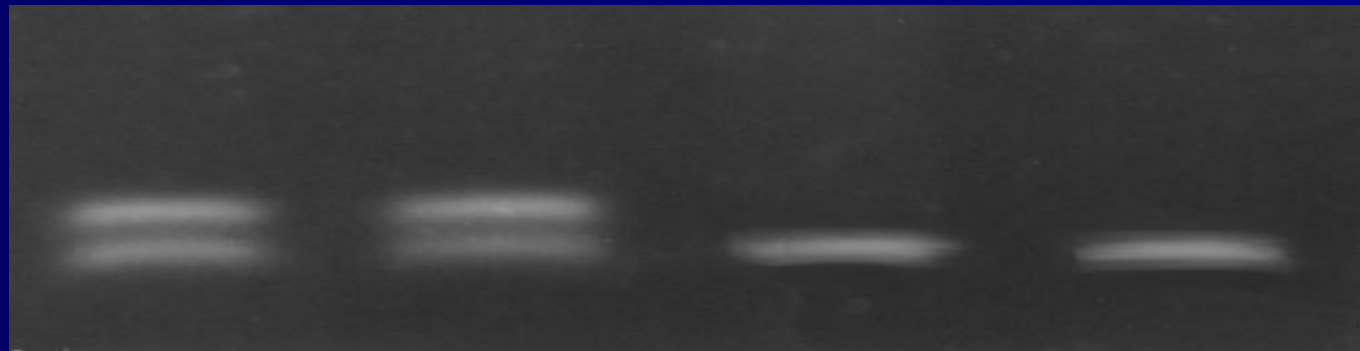
142 п. н.

Отжиг праймера с неполной гомологией на 3'-конце

Аmplification фрагмента ДНК с созданием сайта рестрикции для MspI

Рестрикция MspI

# Анализ мутации R158Q.



123 п.н.  
119 п.н.

1

2

3

4

1, 2 - R158Q/норма;

3, 4 - норма/норма.

# На первом этапе мы рассматривали четыре параллельно протикающие реакции:

1.  $\text{ДНК} + \text{Pr} \rightarrow \text{ДНК} \cdot \text{Pr}$       Образование комплекса  $\text{ДНК} \cdot \text{Pr}$
2.  $\text{ДНК} \cdot \text{Pr} \rightarrow \text{ДНК} + \text{Pr}$       Разрушение комплекса  $\text{ДНК} \cdot \text{Pr}$
3.  $\text{ДНК} + \text{Pr} \rightarrow \text{ДНК}^* \cdot \text{Pr}$       Образование комплекса  $\text{ДНК}^* \cdot \text{Pr}$  с неполной гомологией
4.  $\text{ДНК}^* \cdot \text{Pr} \rightarrow \text{ДНК} + \text{Pr}$       Разрушение комплекса  $\text{ДНК}^* \cdot \text{Pr}$  с неполной гомологией

Концентрации реагентов описываются системой диф. уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dC(\text{ДНК})}{dt} = -\frac{dC(\text{ДНК} \cdot \text{Pr})}{dt} - \frac{dC(\text{ДНК}^* \cdot \text{Pr})}{dt} \\ \frac{dC(\text{ДНК} \cdot \text{Pr})}{dt} = V_1 - V_2 = k_1 \cdot C(\text{ДНК}) - k_2 \cdot C(\text{ДНК} \cdot \text{Pr}) \\ \frac{dC(\text{ДНК}^* \cdot \text{Pr})}{dt} = V_3 - V_4 = k_3 \cdot C(\text{ДНК}) - k_4 \cdot C(\text{ДНК} \cdot \text{Pr}) \end{array} \right.$$

Решив данную систему мы получили:

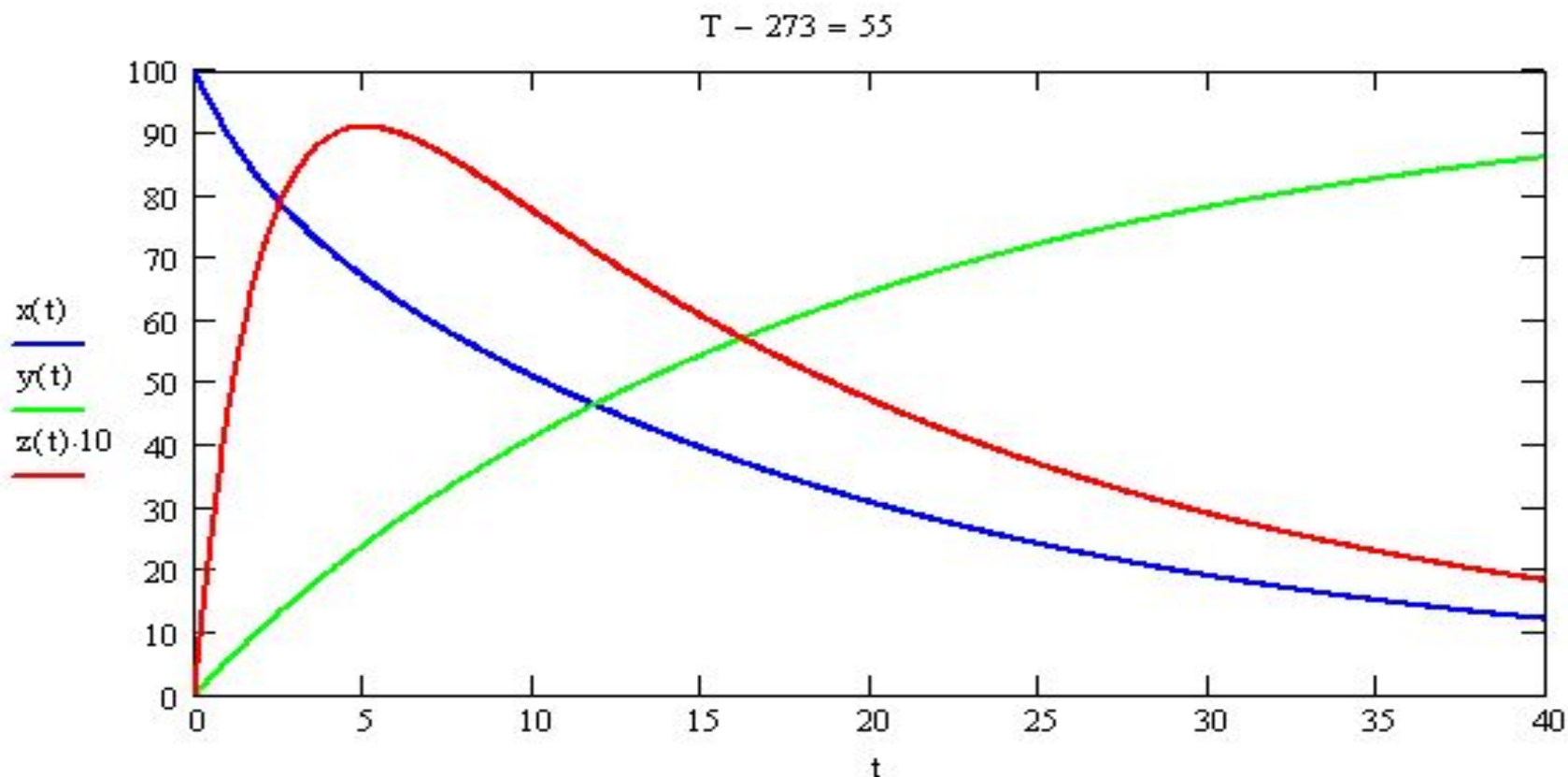
$$C(ssDNA) = \frac{k_4 \cdot a \cdot b_2 + a \cdot k_1 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}{(b_1 - b_2) \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)} \cdot e^{\frac{-(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) + \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}}{2} \cdot t} \cdot \left[ \frac{-(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) + \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}}{2} + k_2 \right] -$$

$$\frac{k_4 \cdot a \cdot b_1 + a \cdot k_1 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}{(b_1 - b_2) \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)} \cdot e^{\frac{-(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) - \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}}{2} \cdot t} \cdot \left[ \frac{-(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) - \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}}{2} + k_2 \right] + \frac{k_2 \cdot k_4 \cdot a}{k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4}$$

$$C(DNA.Pr) = \frac{k_1 \cdot k_4 \cdot a \cdot b_2 + a \cdot k_1 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}{(b_1 - b_2) \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)} \cdot e^{\frac{-(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) + \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}}{2} \cdot t} -$$

$$\frac{k_1 \cdot k_4 \cdot a \cdot b_1 + a \cdot k_1 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}{(b_1 - b_2) \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)} \cdot e^{\frac{-(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) - \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4 \cdot (k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4)}}{2} \cdot t} + \frac{k_1 \cdot k_4 \cdot a}{k_1 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4}$$

# График зависимости концентрации ssДНК и комплексов ДНК·Pr, ДНК·Pr\* от времени



$x(t) - C(\text{ssDNA})$   
 $y(t) - C(\text{ssDNA} \cdot \text{Pr})$   
 $z(t) - 10 \cdot C(\text{ssDNA}^* \cdot \text{Pr})$

## На втором этапе мы рассматривали шесть параллельно протекающие реакции:

1.  $\text{ДНК} + \text{Pr} \rightarrow \text{ДНК} \cdot \text{Pr}$       Образование комплекса ДНК·Pr
2.  $\text{ДНК} \cdot \text{Pr} \rightarrow \text{ДНК} + \text{Pr}$       Разрушение комплекса ДНК·Pr
3.  $\text{ДНК} + \text{Pr} \rightarrow \text{ДНК}^* \cdot \text{Pr}$       Образование комплекса ДНК\*·Pr с неполной гомологией
4.  $\text{ДНК}^* \cdot \text{Pr} \rightarrow \text{ДНК} + \text{Pr}$       Разрушение комплекса ДНК\*·Pr с неполной гомологией
5.  $\text{ssДНК} \cdot \text{Pr} + \text{dNTP} \rightarrow \text{ДНК} + \text{H}_3\text{PO}_4$       Образование двухцепочечной спирали ДНК
6.  $\text{ssДНК}^* \cdot \text{Pr} + \text{dNTP} \rightarrow \text{ДНК}^* + \text{H}_3\text{PO}_4$       Образование двухцепочечной спирали ДНК

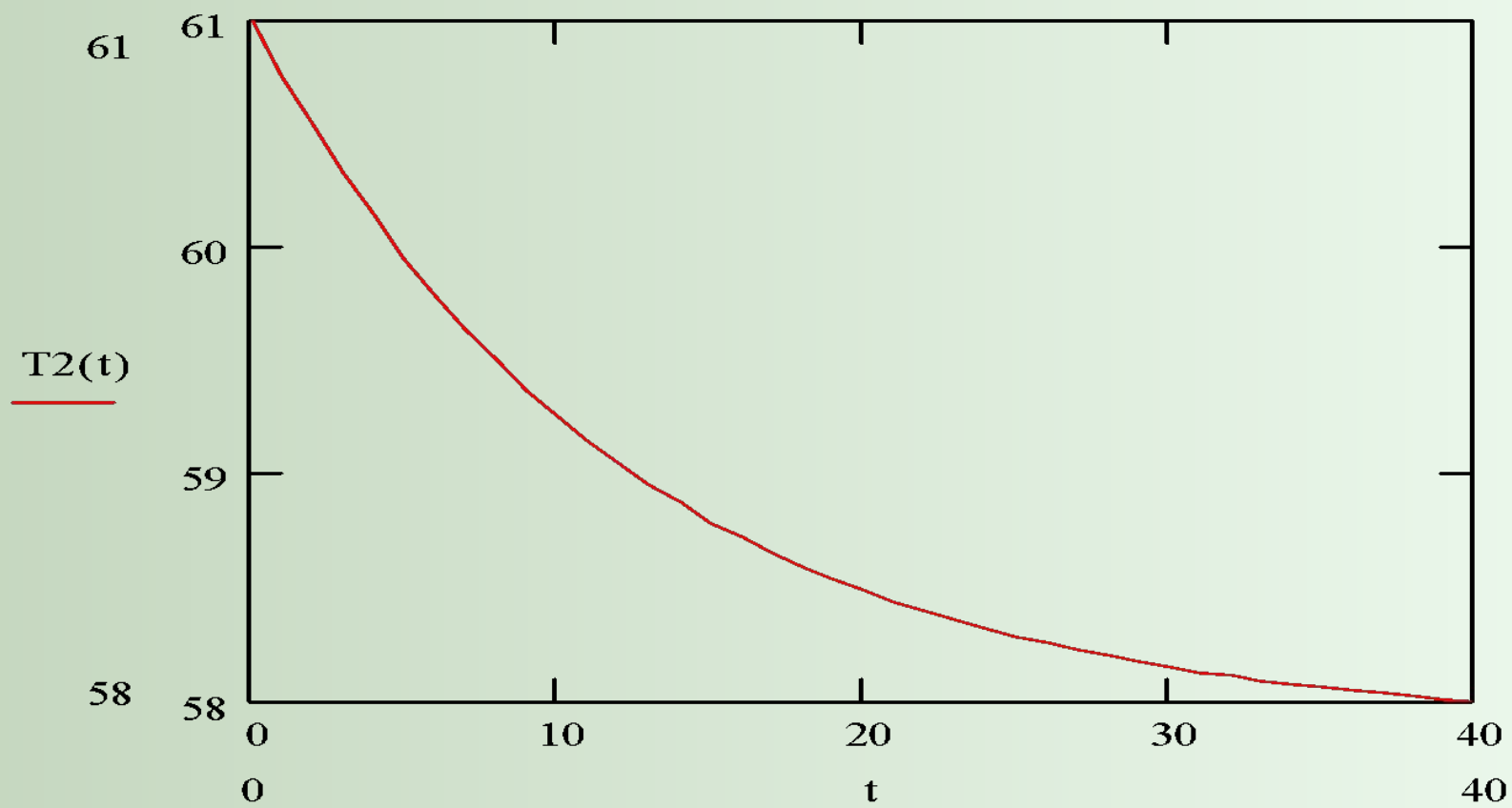


Данные процессы описываются системой диф. уравнений:

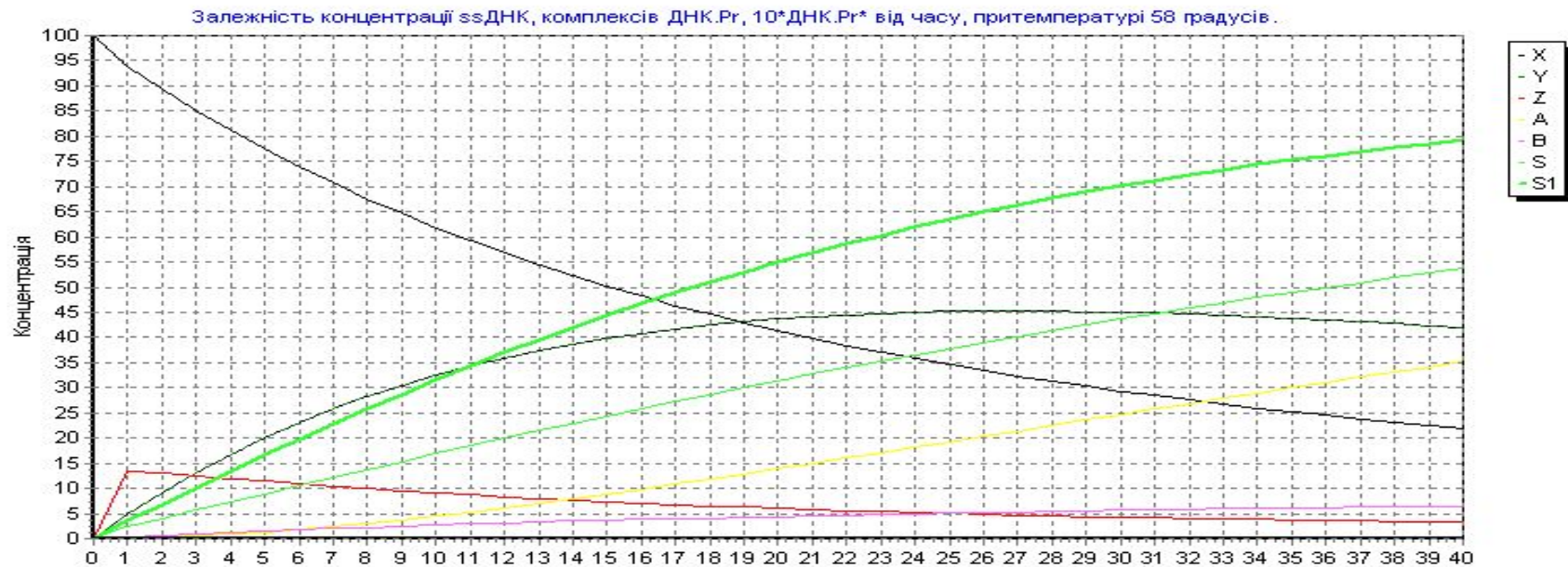
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dC(ssDNA)}{dt} + \frac{dC(ssDNA \cdot Pr)}{dt} + \frac{dC(ssDNA^* \cdot Pr)}{dt} + \frac{dC(DNA)}{dt} + \frac{dC(DNA^*)}{dt} = 0 \\ \frac{dC(ssDNA \cdot Pr)}{dt} = k_1 \cdot C(ssDNA) - k_2 \cdot C(ssDNA \cdot Pr) - k_5 \cdot C(ssDNA \cdot Pr) \\ \frac{dC(ssDNA^* \cdot Pr)}{dt} = k_3 \cdot C(ssDNA) - k_4 \cdot C(ssDNA \cdot Pr) - k_5 \cdot C(ssDNA \cdot Pr) \\ \frac{dC(DNA)}{dt} = k_5 \cdot C(ssDNA \cdot Pr) \\ \frac{dC(DNA^*)}{dt} = k_6 \cdot C(ssDNA^* \cdot Pr) \end{array} \right.$$

Оптимальный температурный режим  
отжига праймеров описывается формулой

$$T=57.88+3.11e^{-0.0825\tau}$$

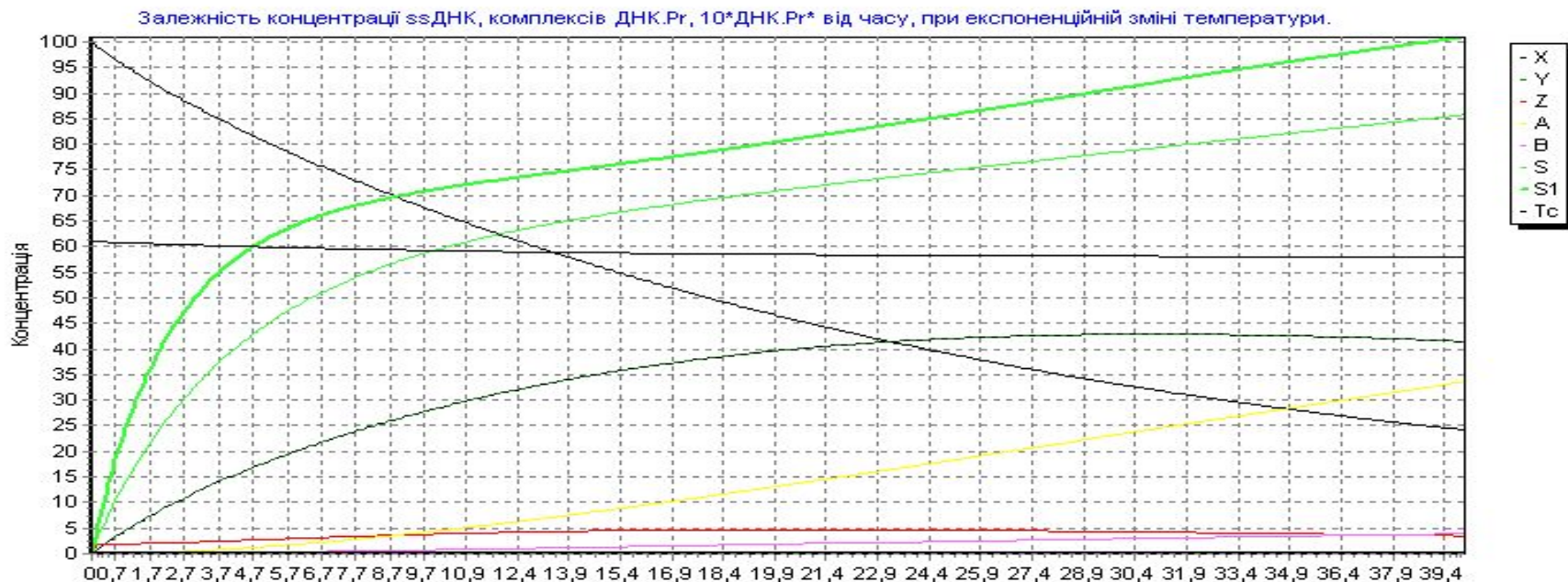


# Зависимость концентрации ssDNA, DNA.Pr, DNA.Pr\* и специфичности от времени, при температуре T=58C



Где: X – концентрация одноцепочечных молекул ДНК; Y - кон. комплексов ДНК·Pr;  
Z - кон. не специфических комплексов ДНК·Pr; A - кон. специфического ПЦР продукта;  
B - кон. не специфического ПЦР продукта; S – отношение специфического ПЦР продукта к неспецифическому; S1 – отношение специфического ПЦР продукта к неспецифическому, рассчитаная при условии что специфические и не специфические комплексы превратятся в ПЦР продукт при элонгации.

# Зависимость концентрации ssDNA, DNA.Pr, DNA.Pr\* и специфичности от времени, при изменении температуры по формуле $T=57.88+3.11e^{-0.0825\tau}$



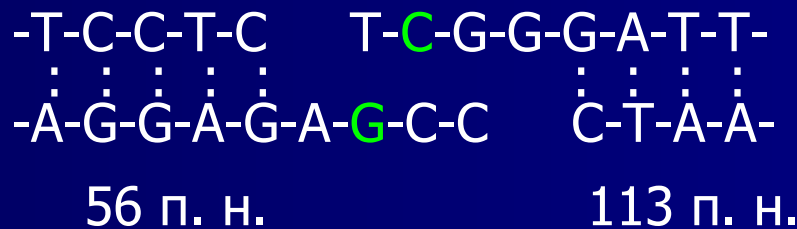
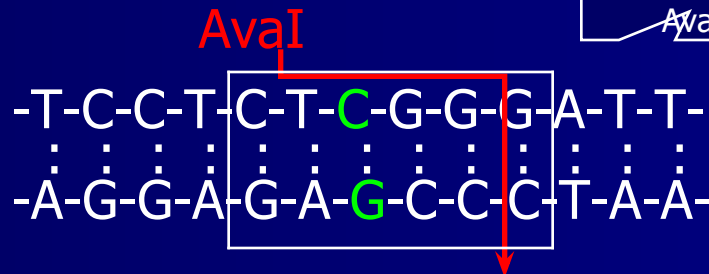
Где: X – концентрация одноцепочечных молекул ДНК; Y - кон. комплексов ДНК·Pr;  
 Z - кон. не специфических комплексов ДНК·Pr; A - кон. специфического ПЦР продукта;  
 B - кон. не специфического ПЦР продукта; S – отношение специфического ПЦР продукта к неспецифическому; S1 – отношение специфического ПЦР продукта к неспецифическому, рассчитаная при условии что специфические и не специфические комплексы превратятся в ПЦР продукт при элонгации.

# Схема рестрикционного анализа для детекции мутаций R252W (эндонуклеаза рестрикции *AvaI*).

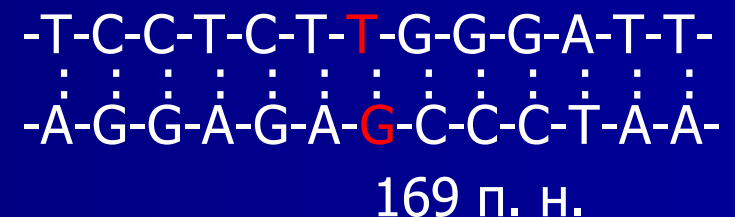
Сайт узнавания *AvaI*  $C \begin{matrix} C \\ T \end{matrix} C G \begin{matrix} G \\ A \end{matrix} G$

Фрагмент "нормальной" последовательности

Сайт узнавания *AvaI*



Фрагмент последовательности с мутацией R252W



# Анализ мутаций R252W



169 п.н.  
147 п.н.  
113 п.н.

1

2

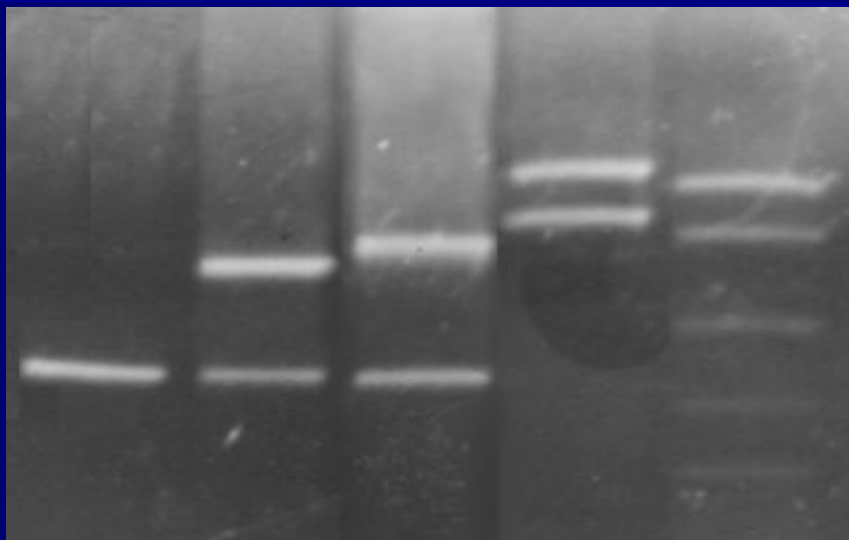
М

1 - R252W/норма

2 - норма/норма

М - Маркер молекулярной массы

# Электрофореграмма продуктов амплификации VNTR – полиморфизма



1 2 3 4 M

1 - генотип 3/3 (380/380 п.н.); 2 - генотип 3/7 (380/500 п.н.);  
3 - генотип 3/8 (380/530 п.н.); 4 - генотип 9/12 (560/650 п.н.);  
M - Маркер молекулярной массы ДНК плазмиды pBR322  
гидролизованная эндонуклеазой MspI

# Выводы

1. Проведен ДНК-анализ мутаций R408W, IVS12nt1, R158Q, Y414C, IVS10nt546 гена ФАГ в 68 образцах. Двадцать три из них в дальнейшем использовались в качестве ДНК-матрицы для амплификации седьмого экзона гена ФАГ.
2. Подобраны условия для амплификации *in vitro* и рестрикции последовательности седьмого экзона гена ФАГ.
3. Рассчитана математическая модель отжига праймеров и предложен оптимальный температурный режим амплификации который представлен в виде функции  $T=57.88+3.11e^{-0.0825t}$ .
4. Проведен анализ аллельного полиморфизма VNTR-локуса гена ФАГ с использованием специфической амплификации *in vitro* последовательности 3'-нетранслированного участка этого гена.
5. Проведенные исследования позволили оптимизировать анализ идентифицируемых мутаций для проведения пренатальной ДНК-диагностики фенилкетонурии с целью предупреждения рождения больных детей.



# Автор выражает благодарность:

Преподавателям факультета биотехнологии и биотехники.

Сотрудникам отдела геномики человека Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Лившиц Людмиле Аврамовне

Нечипоренко Марине Владимировне

Кравченко Сергею Афанасьевичу

Помпуха Владимиру Николаевичу

Грищенко Наталье Владимировне

Ясинской Ольге Анатольевне

Сима Любовь Викторовне