

О.О. СОЛОВЙОВ, Л.А. ЛІВШИЦЬ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ  
E-mail: livshits@imbg.org.ua

**СКРИНІНГ МУТАНТНИХ ВАРІАНТІВ  
ЕКЗОНІВ 5, 7, 12  
ГЕНА ФЕНІЛАЛАНІНГІДРОКСИЛАЗИ  
З ВИКОРИСТАННЯМ  
ДЕНАТУРУЮЧОГО ГРАДІЄНТНОГО  
ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ**



*Розроблено методики аналізу найбільш розповсюджених в Україні мутацій гена фенілаланінгідроксилази (R158Q, R408W, Y414C, P281L, R252W, R261Q) для пацієнтів з фенілкетонурією та здорових людей з використанням скринуючого методу – денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE). Проведено дослідження спектра мутацій гена фенілаланінгідроксилази в 5-му, 7-му, 12-му екзонах з використанням DGGE та подальшим секвенуванням неідентифікованих мутантних варіантів.*

© О.О. СОЛОВЙОВ, Л.А. ЛІВШИЦЬ, 2009

**Вступ.** Фенілкетонурія (ФКУ) є розповсюдженим аутосомно-рецесивним захворюванням, викликаним дефіцитом ферменту печінки – фенілаланінгідроксилази. Виникнення захворювання спричинене мутаціями в гені фенілаланінгідроксилази (ФАГ). На сьогоднішній день відомо понад 530 мутантних варіантів гена ФАГ [1]. У зв'язку з цим скринінг екзонно-інтронних послідовностей даного гена є важливим для діагностики та своєчасного лікування фенілкетонурії. Метою дослідження було розробити методики аналізу найбільш розповсюджених в Україні мутацій гена ФАГ (R158Q, R408W, Y414C, P281L, R252W, R261Q) для пацієнтів з ФКУ та здорових людей з використанням скринуючого методу – денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE) [2]. Нами було проведено дослідження спектру мутацій гена ФАГ в трьох екзонах (5-му, 7-му, 12-му) з використанням DGGE та подальшим секвенуванням неідентифікованих мутантних варіантів.

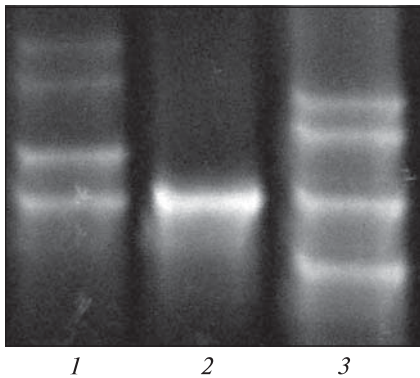
**Матеріали і методи.** Аналіз 5-го, 7-го, 12-го екзонів гена ФАГ проведений нами у 170 здорових людей. Кількість обстежених на ФКУ становила 20 пробандів.

Виділення та очищення ДНК із зразків здійснювали за допомогою гідролізу лізатів лейкоцитів периферичної крові протеїназою К з наступною фенольно-хлороформною екстракцією [3].

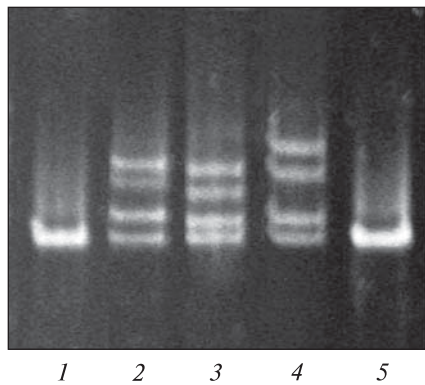
Аналіз послідовності праймерів для ПЛР на специфічність проводили з використанням комп'ютерної бази даних BLAST SEARCH за умов сканування геномної послідовності ДНК відповідних екзонів гена ФАГ. Для оптимізації роздільної здатності методу DGGE до 5'-кінця одного з пари праймерів приєднували GC-багатий фрагмент (GC-clamp). Позицію для приєднання GC-фрагмента визначали за допомогою комп'ютерного алгоритму Melt 87 [4–6]. Аналіз термодинамічних параметрів праймерів проводили з використанням програми Vector NTI Suite 10. Праймери були синтезовані твердофазним фосфоамідитним методом на олігосинтезаторі «Biosset» (Росія).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в автоматичному режимі на термоциклері Perkin Elmer, Cetus. Послідовності праймерів наведені у табл. 1.

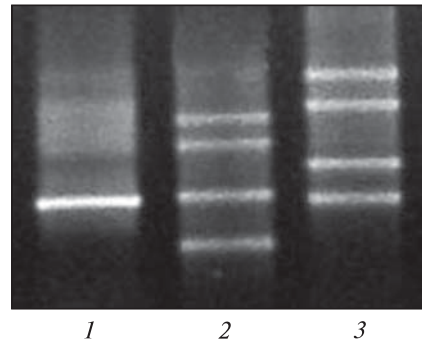
Температурний режим: початкова денатурація при 94 °С – 5 хв, денатурація при 94 °С –



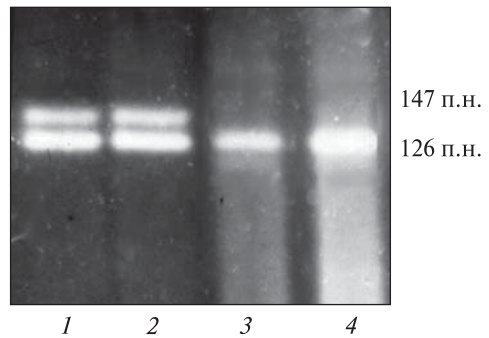
**Рис. 1.** DGGE-електрофореграма мутацій 12-го екзону гена ФАГ. Гель-електрофорез продуктів DGGE в 7%-ному поліакриламідному гелі з градієнтом денатурантів 10–60 %: 1 – R408W/норма, 2 – норма/норма, 3 – Y414C/норма



**Рис. 2.** DGGE-електрофореграма мутацій 7-го екзону гена ФАГ. Гель-електрофорез продуктів DGGE в 7%-ному поліакриламідному гелі з градієнтом денатурантів 10–60 %: 1, 5 – норма/норма, 2 – P281L/норма, 3 – R252W/норма, 4 – R261Q/норма



**Рис. 3.** DGGE-електрофореграма мутації Y414C та поліморфізму Y414Y 12-го екзону гена ФАГ. Гель-електрофорез продуктів DGGE в 7%-ному поліакриламідному гелі з градієнтом денатурантів 10–60 %: 1 – норма/норма, 2 – Y414C/норма, 3 – Y414Y/норма



**Рис. 4.** Рестрикційний аналіз мутації Y414C. Гель-електрофорез продуктів ПЛР, гідролізованих ендонуклеазою рестрикції RsaI, в 1,8%-ному агарозному гелі: 1 – Y414C/норма, 2 – Y414Y/норма, 3, 4 – норма/норма

Таблиця 1  
Нуклеотидні послідовності праймерів для ПЛР ампліфікації 5-го, 7-го, 12-го екзонів гена ФАГ для аналізу методом DGGE [7]

Екзон	Нуклеотидна послідовність
5	5'-TCATGGCTTTAGAGCCCCCA-3' 5'-CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGGCTAGGGGTGTGTTTTTC-3'
7	5'-CGCCCGCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGGTGATGAGCTTT-TAGTTTTCTTTC-3' 5'-AGCAAATGAACCCAAACCTC-3'
12	5'-ATGCCACTGAGAACTCTCTT-3' 5'-CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGACTGAGAAACCGAGTGGCCT-3'

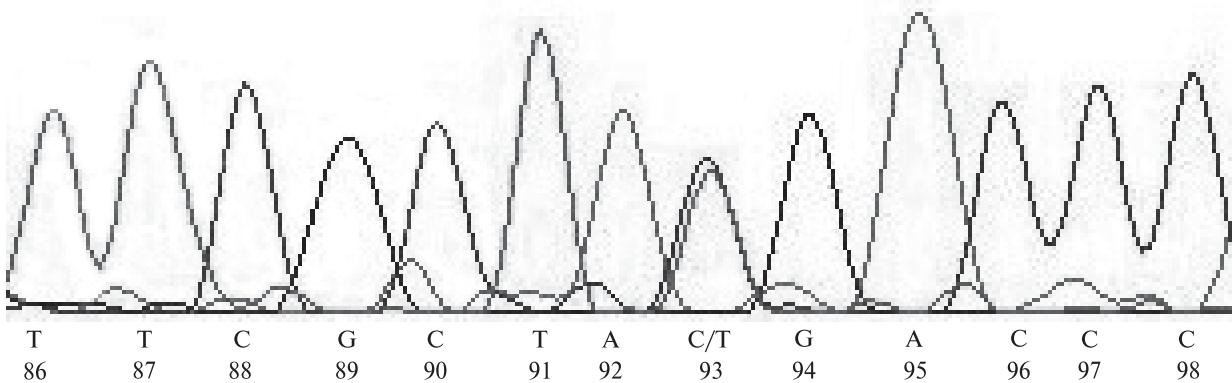


Рис. 5. Аналіз нуклеотидної послідовності 12-го екзону гена ФАГ з використанням методу прямого секвенування продуктів ПЛР, ідентифікація поліморфізму Y414Y

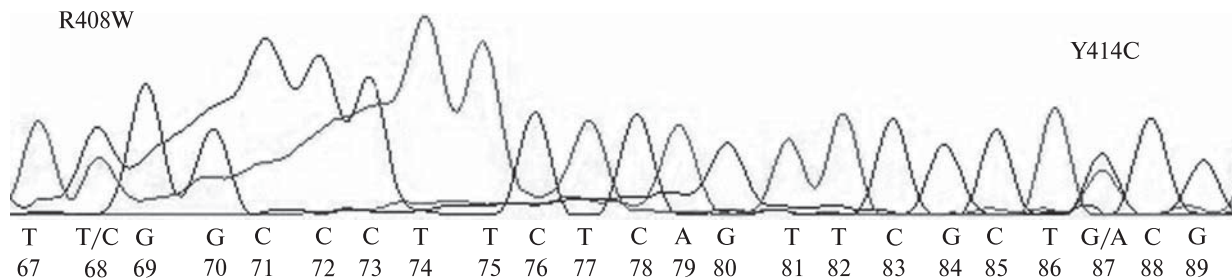


Рис. 6. Аналіз нуклеотидної послідовності 12-го екзону гена ФАГ з використанням методу прямого секвенування продуктів ПЛР, ідентифікація мутацій R408W та Y414C

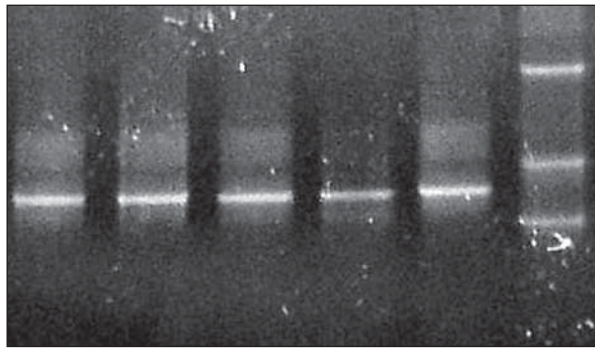


Рис. 7. DGGE-електрофореграма компаунда мутацій R408W та Y414C 12-го екзону гена ФАГ. Гель-електрофорез продуктів DGGE в 7%-ному поліакриламідному гелі з градієнтом денатурантів 10–60 %: 1–5 – норма/норма, 6 – R408W/норма + Y414C/норма

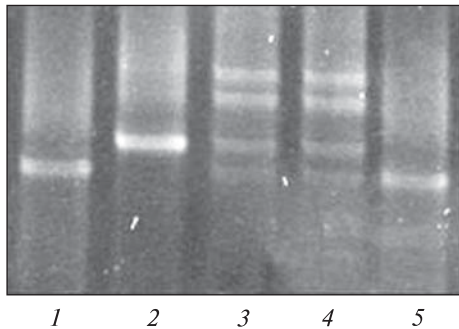
45 с, відпалювання праймерів – 58 °С, 45 с, елонгація 72 °С – 45 с – 30 циклів; фінальна елонгація: 72 °С – 5 хв, денатурація 94 °С – 5 хв, відпалювання 58 °С – 20 хв, формування гетеродуплексів 37 °С – 20 хв.

Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез проводили в 7%-ному поліакриламідному гелі, градієнт денатурантів 10–60 % сечовини з формамідом, температура 60 °С, постійна напруга 180 В, тривалість – 3 год.

Для ідентифікації невідомих мутантних варіантів здійснювали секвенування продуктів ПЛР в автоматичному режимі на секвенаторі Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer, а також застосовували рестрикційний аналіз.

Таблиця 2  
Мутації гена ФАГ, ідентифіковані в результаті дослідження

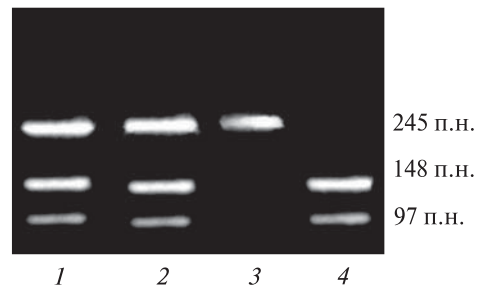
Мутації	Здорові індивіди (n = 113)	Хворі на ФКУ (n = 20)
R408W	4	13
Y414C	–	2
R158Q	–	–
P281L	–	–
R252W	–	1
R261Q	–	5



**Рис. 8.** DGGE-електрофореграма поліморфізму V245V 7-го екзону гена ФАГ. Гель-електрофорез продуктів DGGE в 7%-ному поліакриламідному гелі з градієнтом денатурантів 10–60 %: 1, 5 – норма/норма, 2 – V245V/V245V, 3, 4 – V245V/норма

**Результати досліджень та їх обговорення.** З використанням розроблених методів аналізу мутантних варіантів 5-го, 7-го та 12-го екзонів гена ФАГ (рис. 1 і 2) нами методом DGGE було проведено скринінг цих послідовностей серед 170 здорових осіб та 20 пацієнтів, неспоріднених хворих на ФКУ. Отримані мутантні варіанти перевіряли за допомогою рестрикційного аналізу. Для неідентифікованих мутантних варіантів здійснювали пряме секвенування відповідних продуктів ПЛР. В табл. 2 наведено мутації, виявлені за допомогою денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу.

В результаті скринінгу 12-го екзону гена ФАГ було знайдено невідомий мутантний варіант (рис. 3). Рестрикційний аналіз з використанням ендонуклеази рестрикції RsaI [7, 8] зразків з неідентифікованим мутантним варіантом показав однаковий профіль з мутацією Y414C (рис. 4). Для точного визначення даного варіанту застосовували пряме секвенування продукту ПЛР. Було ідентифіковано поліморфізм Y414Y (1242C > T) (рис. 5), який виявили у 5 здорових осіб (частота алеля 2,21 %). Серед хворих на ФКУ цей поліморфізм не був знайдений. Ідентифікація поліморфізму Y414Y є дуже важливою, оскільки в результаті ПДРФ-аналізу мутація Y414C має ідентичний профіль з Y414Y на електрофореграмі. У зв'язку з цим проведення скринінгу за допомогою методу денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу дозволяє диференціювати мутацію Y414C від нейтрального поліморфізму Y414Y. В результаті скринінгу 12-го екзону серед 20



**Рис. 9.** Рестрикційний аналіз поліморфізму V245V. Гель-електрофорез продуктів ПЛР, гідролізованих ендонуклеазою рестрикції AluI, в 1,8%-ному агарозному гелі. 1, 2 – V245V/норма; 3 – норма/норма; 4 – V245V/V245V

хворих на ФКУ виявили невідомий DGGE-профіль, а за результатами прямого секвенування цих зразків встановили, що згаданий профіль відповідає за компаунд мутацій R408W та Y414C (рис. 6 та 7).

Скринінгове дослідження 7-го екзону гена ФАГ методом DGGE здійснювали серед 57 здорових людей та 20 хворих на ФКУ. В результаті виявили невідомий алельний варіант (рис. 8). Для його визначення проводили рестрикційний аналіз продуктів ПЛР з використанням ендонуклеази рестрикції AluI (рис. 9). Було ідентифіковано нейтральний поліморфізм V245V (735G > A), який не призводить до заміни амінокислоти. Цей поліморфізм виявили у здорових осіб ( $n = 57$ , частота алеля – 36,84 %) і серед хворих пробандів ( $n = 20$ , частота алеля – 12,5 %).

Таким чином, проведення скринінгу поліморфізмів Y414Y та V245V дозволяє встановити точнішу молекулярно-генетичну діагностику фенілкетонурії.

**Висновки.** В результаті скринінгових досліджень 5-го, 7-го та 12-го екзонів гена ФАГ серед хворих на ФКУ та здорових людей виявлено мутації R408W, Y414C, R252W, R261Q. Ідентифіковано нейтральний поліморфізм Y414Y (12-й екзон), частота алеля – 2,21 %,  $n = 113$ ; V245V (7-й екзон), частота алеля серед здорових осіб ( $n = 113$ ) – 36,84 %, серед хворих ( $n = 20$ ) – 12,5 %. Розроблені методики скринінгу 5-го, 7-го та 12-го екзонів гена ФАГ та ідентифікація нейтральних поліморфізмів Y414Y та V245V дозволяють розробити методичні підходи до створення тест-систем для скринінгу фенілкетонурії серед населення України.

O.O. Soloviov, L.A. Livshits

SCREENING FOR MUTATION VARIANTS  
IN EXONS 5, 7, 12 PAH GENE  
USING DENATURING GRADIENT  
GEL-ELECTROPHORESIS

The assays for analysis of the most frequent mutations of PAH gene in Ukraine (R158Q, R408W, Y414C, P281L, R252W, R261Q) for RCU patients and healthy people using denaturing gradient gel-electrophoresis (DGGE) were developed. The study of spectrum of mutations in exons 5,7,12 PAH gene using DGGE technique and further sequencing of unidentified mutant variants was held.

А.А. Соловьёв, Л.А. Лившиц

СКРИНИНГ МУТАНТНЫХ  
ВАРИАНТОВ ЭКЗОНОВ 5, 7, 12  
ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕНАТУРИРУЮЩЕГО  
ГРАДИЕНТНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Разработаны методики анализа наиболее распространенных в Украине мутаций гена фенилаланин-гидроксилазы (R158Q, R408W, Y414C, P281L, R252W, R261Q) для больных фенилкетонурией и здоровых людей с применением метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE). Проведено исследование спектра мутаций гена фенилаланин-гидроксилазы в 5-м, 7-м, 12-м экзонах с применением DGGE и дальнейшим секвенированием неидентифицированных мутантных вариантов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase*, [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca).
2. *Guldberg P., Guttler F.* A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis // *Nucl. Acids Res.* – 1993. – **21**, № 9. – P. 2261–2262.
3. *Маниатис Т., Фрич Е.Е., Сэмбрук Ж.* Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1985. – 420 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. – **80**. – P. 1579–1583.
5. *Fischer S.G., Lerman L.S.* Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1980. – **77**, № 8. – P. 4420–4424.
6. *Lerman L.S., Silverstein K.* Computational simulation of DNA melting and its application to DGGE // *Meth. Enzym.* – 1987. – **155**. – P. 482–501.
7. *Нечипоренко М.В., Кравченко С.А., Лившиць Л.А.* Аналіз мутацій та VNTR-поліморфізму гена фенілаланінгідроксилази // *Укр. біохім. журн.* – 2001. – **73**, № 2. – С. 63–67.
8. *Нечипоренко М.В., Лившиць Л.А.* Аналіз мутацій гена фенілаланінгідроксилази в семьях високого ризику фенілкетонурии в Україні // *Цитология и генетика.* – 2000. – **34**, № 6. – С. 59–63.

Надійшла 21.08.08