



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19773 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 8/00
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ МУТАЦІЇ 657DEL5 ГЕНА NBSL

1

(21) u200609485
(22) 01.09.2006
(24) 15.12.2006
(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.
(72) Кашин Олексій Ігорович, Акоюн Гаяне Рубе-
нівна, Заставна Данута Володимирівна
(73) ІНСТИТУТ СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
(57) Спосіб діагностики мутації 657del5 гена nbsl,
що включає виділення ДНК, отримання та амплі-

2

фікацію фрагментів екзону 6 гена nbsl, електро-
форетичне розділення продуктів ампліфікації, фа-
рбування та візуалізацію розділених фрагментів,
який **відрізняється** тим, що після ампліфікації
фрагментів екзону 6 гена nbsl проводять реакції
формування гетеродуплексних фрагментів між
досліджуваними ампліконами та фрагментами, що
несуть та не несуть мутацію 657del5 гена nbsl.

Корисна модель відноситься до галузі меди-
цини, зокрема - медичної генетики і може бути
використана для детекції мутації 657del5 гена nbsl
у людини, наявність якої засвідчує спадкову хво-
робу Ніймегена.

Відомі способи діагностики мутації 657del5 ге-
на nbsl ґрунтуються на виділенні ДНК, отриманні
фрагментів екзону 6 гена nbsl, ампліфікації цих
фрагментів, формуванні конформаційних варіантів
одноланцюгових фрагментів отриманих ампліко-
нів, електрофоретичному розділенні їх протягом
10-12 годин на холоді з наступним фарбуванням
протягом 2 годин солями срібла [1].

Недоліком цього способу є довготривалість та
трудомісткість.

Найближчим аналогом є спосіб діагностики
мутації 657del5 гена nbsl, який включає виділення
ДНК, отримання фрагментів екзону 6 гена nbsl,
ампліфікацію цих фрагментів, електрофоретичне
розділення у 7% поліакриламідному гелі отрима-
них ампліконів протягом 4 годин з наступним фар-
буванням розчином бромистого етидію протягом
10 хвилин та візуалізацією продуктів розділення в
ультрафіолетовому світлі [2].

Недоліком аналогу є неоднозначність резуль-
татів: процес дозволяє фіксувати, окрім мутації
657del5, ще й інші мутації екзону 6 гена nbsl, по-
скільки електрофоретичне розділення у 7% поліак-
риламідному гелі не завжди дозволяє добитися
візуально видимої різниці у 5 нуклеотидних пар,
що є основним критерієм детекції мутації 657del5
гена nbsl. Отже, для кінцевого уточнення резуль-

тату процес необхідно продовжити із застосуван-
ням методу секвенування ДНК, тобто збільшують-
ся терміни та вартість проведення аналізу.

Задачею корисної моделі є розробка такого
способу діагностики мутації 657del5 гена nbsl, який
би за рахунок доступних та недорогих методів до-
зволяв однозначно встановлювати в гені nbsl саме
мутації 657del5 у короткий відрізок часу проведен-
ня аналізу.

Поставлена задача вирішується тим, що у
способі діагностики мутації 657del5 гена nbsl, який
включає виділення ДНК, ампліфікацію фрагментів
екзону 6 гена nbsl, згідно з корисною моделлю, піс-
ля ампліфікації проводять реакцію формування
гетеродуплексів між ампліконами досліджуваної
ДНК та 2 (двома) контрольними взірцями ДНК, в
екзоні 6 гена nbsl яких або присутня, або відсутня
мутації 657del5 з наступним розділенням отрима-
них ампліконів у 10% поліакриламідному гелі полі-
акриламідному гелі протягом 4 годин.

Спосіб забезпечує точну ідентифікацію мутації
657del5 гена nbsl при зменшенні часу діагностики
та здешевленні проведеного аналізу.

Спосіб використовують наступним чином: ви-
діляють ДНК з цільної крові типовим фенольним
методом, ампліфікують фрагменти екзону 6 гена
nbsl з використанням відповідних олігонуклеотид-
них праймерів, ампліфіковані фрагменти очищу-
ють та концентрують у буфері, що містить 10mM
TRIS-HCl, 0.1mM EDTA. до кінцевої концентрації
10нг/мкл, проводять реакцію формування гетеро-
дуплексних фрагментів, змішуючи суміші фрагме-

(13) U

(11) 19773

(19) UA

нтів екзону 6 відомої послідовності ДНК та досліджуваної ДНК у співвідношенні 3:1. Кінцеву суміш покривають мінеральним маслом та переносять у нагрітий до 95°C термостат. Денатурація зразків триває 5 хвилин, після чого реакційну суміш для формування гетеродуплексних фрагментів ДНК негайно переносять у нагрітий до 55°C термостат та інкубують протягом 45 хвилин. Для того, щоб уникнути негативної дії температури зовнішнього середовища при перенесенні з термостату в термостат, використовують термостат, температура якого автоматично регулюється мікрокомп'ютером. Гібридизацію проводять протягом 1 години, після чого суміш охолоджують та зберігають при 4°C. Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводять у 10% поліакриламідному гелі, протягом 4 годин.

Приклад 1.

Павло С., 12.07.1996 р.н., народився та постійно проживає у с. Штунь, Волинської області. Звернувся у 2004 році до Львівського медико-генетичного центру. При обстеженні була виявлена мікроцефалія, часті бронхо-легеневі захворювання в анамнезі. На підставі первинного клінічного діагнозу "синдром Ніймегена" була проведена молекулярно-генетична діагностика мутацій екзону 6 гена *pbsl* згідно запропонованого процесу.

З 5мл венозної крові пацієнта класичним фенольним методом виділено ДНК, яка отримала код N22. Фрагменти екзону 6 гена *pbsl* отримували відомим методом ампліфікації з використанням олігонуклеотидних праймерів, комплементарних екзону 6; ампліфіковані фрагменти очищали згідно загальноприйнятих методів, розчинивши фрагменти у буфері, що містить 10mM TRIS-HCl, 0.1mM EDTA. Концентрацію фрагментів ДНК вимірювали оптичним методом: кінцева концентрація фрагментів у буфері складала 10нг/мкл. До 15мкл попередньо втриманих фрагментів екзону 6 відомої послідовності ДНК додавали 5 мкл суміші після шпільфікації екзону 6 гена *pbsl*, яка містила ампліфіковані фрагменти досліджуваної ДНК у яввідношенні 3:1. Кінцеву суміш покривали мінеральним маслом та переносили у нагрітий до 55°C термостат на 5 хвилин, після чого реакційну суміш переносили у нагрітий до 55°C термостат та інкубують протягом 45 хвилин. Гібридизацію проводять протягом 1 години, після чого суміш охолоджують та зберігають при 4°C.

Після реакції формування гетеродуплексних фрагментів ДНК проводили електрофоретичне розділення фрагментів ДНК у 10% поліакриламідному гелі, при цьому нанесення досліджуваних зразків для електрофоретичного розділення проводять згідно наступного порядку: контрольний зразок ДНК, що не містить мутацій екзону 6 (лунка 1); досліджуваний зразок ампліфікованого фрагменту ДНК (лунка 2); продукт реакції формування гетеродуплексів між досліджуваним зразком ампліфікованого фрагменту ДНК та попередньо отриманими фрагментами ДНК відомої послідовності, що не несуть мутації 657del5 гена *pbsl* (лунка 3); продукт реакції формування гетеродуплексів між досліджуваним зразком ампліфікованого фрагменту ДНК та попередньо отриманими фрагментами ДНК відомої послідовності, що містять мутацію

657del5 гена *pbsl* (лунка 4). Перед зразками ДНК обов'язково наносили маркери молекулярної ваги. У лунки 1 та 2 наносять по 10мкл зразка, у лунки 3 та 4 наносять по 15мкл зразка. Електрофоретичне розділення проводили у 10% поліакриламідному гелі (при співвідношенні акриламід до бісакриламід 29:1) з використанням трис-боратного буферу при напрузі 200V/150mA протягом 4 годин. Після електрофоретичного розділення гель фарбується розчином бромистого етидію (концентрація останнього складає 1мг/л) та оцінювалися результати.

Отримані результати свідчать про те, що:

1. Ампліфіковані фрагменти екзону 6 гена *pbsl* зразка N22 характеризувалися збільшеною електрофоретичною активністю у порівнянні з контрольним зразком, що передбачає присутність делеції в екзоні 6 гена *pbsl* в зразку N22;

2. Виявлено наявність гетеродуплексних фрагментів при взаємодії ампліфікованих фрагментів досліджуваного зразка N22 та попередньо отриманих фрагментів ДНК екзону 6 гена *pbsl* що не містять мутації гена *pbsl*. Це підтверджує припущення 1;

3. Виявлено відсутність гетеродуплексних фрагментів при взаємодії ампліфікованих фрагментів досліджуваного зразка N22 та попередньо отриманих фрагментів ДНК екзону 6 гена *pbsl* що містять мутацію 657del5 гена *pbsl*, що підтверджує попередні пп.1 та 2 про наявність мутацій екзону 6 гена *pbsl* у досліджуваному зразку N22.

Отже, в результаті проведення молекулярно-генетичної діагностики виявлено наявність мутації 657del5 екзону 6 гена *pbsl* в зразку N22.

Приклад 2.

Євген К., 23.04.1990 р.н., народився та постійно проживає у м. Симферополі. Звернувся у 2004 році до хірурга в зв'язку зі збільшенням шийно-латеральних вузлів. Діагноз: Неоджкінська Т-клітинна лімфобластна лімфома III ступеня з ураженням лімфовузлів шийно-латеральної області зліва, I терапевтична група. Супутній діагноз: синдром Ніймегена.

На підставі супутнього діагнозу "синдром Ніймегена" 14.02.2006 р. була проведена молекулярно-генетична діагностика мутацій екзону 6 гена *pbsl* згідно запропонованого процесу.

З 5мл венозної крові пацієнта класичним фенольним методом виділено ДНК, яка отримала код N75. Фрагменти екзону 6 гена *pbsl* отримували, як описано вище, відомим методом ампліфікації з використанням олігонуклеотидних праймерів, комплементарних екзону 6; ампліфіковані фрагменти очищали згідно загальноприйнятих методів, розчинивши фрагменти у буфері, що містить 10mM TRIS-HCl, 0.1mM EDTA. Після реакції формування гетеродуплексних фрагментів ДНК проводили електрофоретичне розділення фрагментів ДНК у 10% поліакриламідному гелі.

А. Ампліфіковані фрагменти екзону 6 гена *pbsl* зразка N75 характеризувалися однаковою електрофоретичною активністю у порівнянні з контрольним зразком, що передбачало відсутність мутації в екзоні 6 гена *pbsl* в зразку N75.

Б. Виявлено відсутність гетеродуплексних фрагментів при взаємодії ампліфікованих фрагментів досліджуваного зразка N75 та попередньо

отриманих фрагментів ДНК екзону 6 гена nbsl що не містять мутації гена nbsl. Це підтверджує припущення пункту А.

Отже, в результаті проведення молекулярно-генетичної діагностики не було виявлено мутацій екзону 6 гена nbsl в зразку N75.

Запропонований спосіб застосований при 96 дослідженнях. При цьому, в 34 випадках вдалося діагностувати наявність мутації 657del5, а в 62 випадках вона була відсутня. В той час, як при використанні найближчого аналога однозначний діагноз (без продовження процесу із застосуванням методу секвенування ДНК) не вдалося встановити у жодному випадку.

Таким чином, використання запропонованого способу дозволяє збільшити ефективність діагно-

тики при зниженні тривалості процесу та зменшенні матеріальних видатків.

Джерела інформації:

1. Patrick J. Concannon; Christine S. Vissinga; Karen M. Cerosaletti; Raymonda Varon-Mateeva;

Karl Sperling; Andre Wiesmann da Silva Reis. A gene associated with Nijmegen breakage syndrome, it's gene product and methods for their use - International Application № WO 99/55716; Filed April 27, 1998; Date of Patent: November 4, 1999.

2. I.B. Resnick, I. Kondratenko, O. Togoev, N. Vasserman, I. Shagina, O. Evgrafov, S. Tverskaya, K. M. Cerosaletti, R. A. Gatti, P. Concannon. Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families // J. Pediatr. - 2002. - Vol. 140. - p. 355-361.