



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64654 (13) U

(51) МПК

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДНК-ДІАГНОСТИКИ МАЖОРНОЇ МУТАЦІЇ □ F508 В ГЕНІ ТРАНСМЕМБРАННОГО РЕГУЛЯТОРНОГО БІЛКА МУКОВІСЦИДОЗУ (CFTR)

1

(21) u201105507

(22) 29.04.2011

(24) 10.11.2011

(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.

(72) СОЛОВІЙОВ ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ,
КРАВЧЕНКО СЕРГІЙ АФАНАСІЙОВИЧ, ЛІВШИЦЬ
ЛЮДМИЛА АВРАМОВНА(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕ-
ТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) Спосіб ДНК-діагностики мажорної мутації
ΔF508 в гені трансмембранного регуляторного
білка муковісцидозу (CFTR), який включає забір
матеріалу у пацієнта, виділення ДНК фенольно-
хлороформним методом, ампліфікацію послідов-
ності гена CFTR, що містить мутацію ΔF508 та

2

наступний аналіз продуктів ампліфікації за допо-
могою полімеразної ланцюгової реакції в реаль-
ному часі, який **відрізняється** тим, що детекцію
мутації проводять з застосуванням гібридизацій-
них зондів типу TaqMap для нормального та мута-
нтного алелів, при цьому для детекції нормального
алеля використовують зонд -HEX-
AACACCAAGATGATATT-BHQ1, а для детекції
алеля делецією з ΔF508 - Cy5-
GGAAACACCAATGATATTBHQ2, праймери для
обох зондів: прямий -AGTTTTCTGGATTATGCCT,
зворотний - AGTTGGCATGCTTTGATGAC, а за ре-
зультатами дослідження виявляють мажорну му-
тацію чи її відсутність.

Дана корисна модель належить до області бі-
отехнології, молекулярної біології, медицини та
може бути використана для швидкої детекції му-
тації ΔF508 в гені CFTR (ген трансмембранного
білка муковісцидозу) з метою масового скринінгу
зразків, а більш конкретно до способу ДНК-
діагностики мажорної мутації ΔF508 в гені транс-
мембранного регуляторного білка муковісцидозу
(CFTR).

Муковісцидоз (МВ) (кістозний фіброз підшлун-
кової залози) - найбільш розповсюджене спадкове
захворювання моногенної природи з аутосомно-
рецесивним типом успадкування. Частота захво-
рювання на муковісцидоз в різних популяціях сут-
тєво варіює і складає в середньому 1:2-2,5 тис.
Патогенез даного захворювання пов'язаний з ная-
вністю мутацій в гені CFTR. Найбільш розповсю-
дженою мутацією є тринуклеотидна делеція
ΔF508, частота якої становить в Україні 41 %.

Відомі способи діагностики муковісцидозу, які
засновані на ампліфікації методом полімеразної
ланцюгової реакції (ПЛР) послідовностей екзонів
гена CFTR, які містять мутацію ΔF508 та подаль-
шим аналізом продуктів ампліфікації:

1. Відомий метод алель-специфічної гібриди-
зації з міченими ДНК-зондами, (Kerem et al.,

Identification of the cystic fibrosis gene: genetic
analysis. Science, 1989, v. 245, p. 1073-1080).

2. Відомий метод прямої ампліфікації ДНК з
п'ям крові з наступною ідентифікацією мутації
методом оцінки наявності гетеродуплексів, який
включає проведення ПЛР послідовності, яка міс-
тить делецію ΔF508 з подальшим електрофорети-
чним фракціонуванням на 10 % поліакриламідно-
му гелі (Гусак Н. М., Горovenko Н. Г., Хоменко Н. Л.,
Бужиевська Т. І. Методологічні підходи до спро-
щення та прискорення процедури ідентифікації
мутації ΔF508 в гені трансмембранного регулятор-
ного білка муковісцидозу // Біополімери і клітина. -
1994. - т. 10, N 3-4. - С. 58-62).

Проте впровадження цих способів у практику
має ряд обмежень через певні недоліки. До недо-
ліків першого способу можна віднести високу вар-
тість мічених ДНК-зондів, мембран та інших реак-
тивів. Недоліками другого способу слід віднести
додавання ДНК з відомим генотипом після амплі-
фікації, що ускладнює діагностику муковісцидозу
при проведенні масового скринінгу. Крім того, не
проводиться контроль якості ДНК, яка береться
для ампліфікації, оскільки при низьких концентра-
ціях зразка ДНК детекція гетеродуплексів може
бути ускладнена навіть при додаванні контрольних
зразків ДНК.

(19) UA (11) 64654 (13) U

Найбільш близьким до заявленого способу за досягнутим результатом є спосіб діагностики муковісцидозу шляхом детекції мутації ΔF508 методом алей-специфічної ампліфікації з використанням двох пар праймерів на нормальний та мутантний алелі (патент РФ № 2151188, МПК C12Q1/68, C12N15/11, G01N33/48/, опубліковано 20.06.2000). Суть способу полягає у виявленні делеції ΔF508 гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу за допомогою методу алей-специфічної ПЛР з використанням двох пар праймерів на нормальний та мутантний алелі з подальшим аналізом результатів шляхом електрофоретичного фракціонування продуктів ПЛР у 4 % поліакриламідному гелі. Недоліком даного способу є нижча специфічність та значна тривалість процесу, обумовлена тим, що для діагностики муковісцидозу необхідне проведення двох паралельних реакцій ПЛР для визначення мутації в різних пробірках та крос-контaminaція зразків на стадії електрофоретичного фракціонування.

В основу запропонованої корисної моделі поставлено задачу розробки такого способу ДНК-діагностики мажорної мутації в гені трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу (CFTR), який би був більш специфічним та менш тривалим. Поставлена задача вирішується за рахунок створення умов для виявлення мутації за одну реакцію ПЛР в одній пробірці, скорочення тривалості ампліфікації та уникнення стадії електрофоретичного фракціонування.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом ДНК-діагностики мажорної мутації ΔF508 в гені трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу (CFTR), який включає забір матеріалу у пацієнта, виділення ДНК фенольно-хлороформним методом, ампліфікацію послідовності гена CFTR, що містить мутацію ΔF508 та наступний аналіз продуктів ампліфікації за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі, а відповідно до пропозиції детекцію мутації проводять з застосуванням гібридаційних зондів типу TaqMan для нормального та мутантного алелів, при цьому для детекції нормального алеля використовують зонд - HEX-AACACCAAGATGATATT-BHQ1, а для детекції алеля делецією з ΔF508 - Cy5-GGAAACACCAATGATATTBHQ2, праймери для обох зондів: прямий - AGTTTTCTGCTGGATTATGCCT; зворотний - AGTTGGCATGCTTTGATGAC, а за результатами дослідження виявляють мажорну мутацію чи її відсутність.

Суть пропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де:

на Фіг. 1 схематично приведено діаграму алейної дискримінації зразків ДНК, де ● - зразок без мутації; ▲ - гетерозиготний носій мутації; ◆ - негативний контроль ампліфікації (НК);

на Фіг. 2 - схематично приведено діаграму алейної дискримінації контрольних зразків ДНК, де ■ - носії мутації в гомозиготному стані; ▲ - гетерозиготний носій мутації.

Діагностику проводять за наявності флуоресцентних сигналів специфічних зондів:

- у випадку зразка без мутації фіксують флуоресцентний сигнал HEX та відсутність флуоресцентного сигналу Cy5;

- у випадку носія мутації у гетерозиготному стані фіксують одночасно флуоресцентні сигнали обох зондів;

- у випадку мутації у гомозиготному стані спостерігають флуоресцентний сигнал Cy5.

З метою контролю якості запропонованого способу проводили "сліпий" аналіз 18 зразків ДНК, серед яких були нормальні зразки ДНК, зразки з делецією у гомо- та гетерозиготному станах. Було виявлено: 12 нормальних зразків, 5 носіїв делеції ΔF508 у гетерозиготному стані, одного носія ΔF508 у гомозиготному стані, що було підтверджено незалежними методами.

Суттєвими відмінностями заявленого способу в порівнянні з відомим є наступні:

1. У заявленому способі в порівнянні з відомим використовують принципово новий підхід ПЛР в реальному часі з застосуванням гібридаційних зондів типу TaqMan, який є більш специфічним методом.

2. Аналіз мутації ΔF508 проводять в одній пробірці.

3. Заявлений спосіб дозволив проводити діагностику мутації ΔF508 тривалістю півтори години (у відомих способах подібна діагностика триває приблизно чотири години).

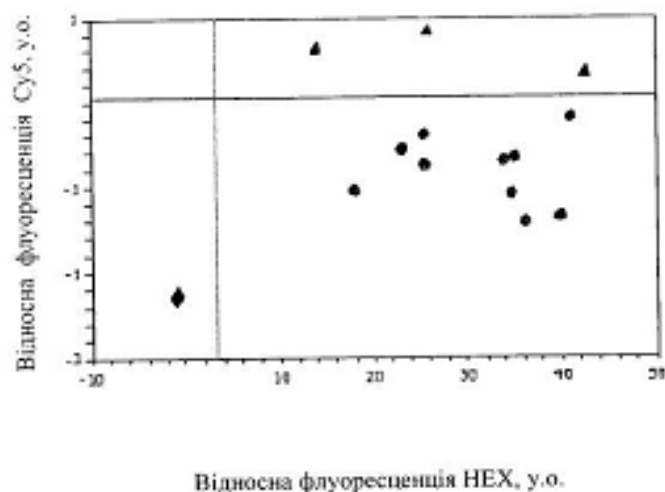
4. Виключається стадія електрофоретичного фракціонування продуктів ПЛР. Корисна модель ілюструється наступними прикладами конкретного застосування.

Приклад 1. Геномну ДНК 13 індивідів з загальної популяції виділяли з периферійної крові з використанням протеїнази К та очищували за допомогою фенольно-хлороформної екстракції. Суміш для ампліфікації об'ємом 25 мкл містила: двократний ампліфікаційний буферний розчин з KCl (виробництво фірми Fermentas, Литва); MgCl₂ - 3,75 мМ; бичачий сироватковий альбумін - 170 мкг/мл; ДНТФ - 400 мкМ кожного типу; концентрація праймерів - 10 мкМ; концентрація зондів - 5 мкМ; ДНК - 1 мкг; Taq-полімераза - 0,5 од. активності на пробу. Для ампліфікації використовували систему праймерів прямий - AGTTTTCTGCTGGATTATGCCT; зворотний - AGTTGGCATGCTTTGATGAC та флуоресцентних зондів типу TaqMan, гомологічні послідовності без мутації - HEX-AACACCAAGATGATATT-BHQ1, та послідовності з делецією ΔF508 - Cy5-GGAAACACCAATGATATTBHQ2 за допомогою методу ПЛР в реальному часі. Використовується двоступінчастий режим ампліфікації (95 °C - 20 с, 54 °C - 50 с) впродовж 35 циклів до досягнення ампліфікаційними кривими стадії "плато". Реєстрація флуоресцентних сигналів HEX та Cy5 відбувалася наприкінці стадії "елонгації". Результати алейної дискримінації зразків наведено на Фіг. 1. За результатами аналізу було встановлено гетерозиготне носійство делеції ΔF508 у трьох зразках ДНК (праве верхнє поле діаграми), 10 зразків ДНК мали нормальний генотип (праве нижнє поле на діаграмі).

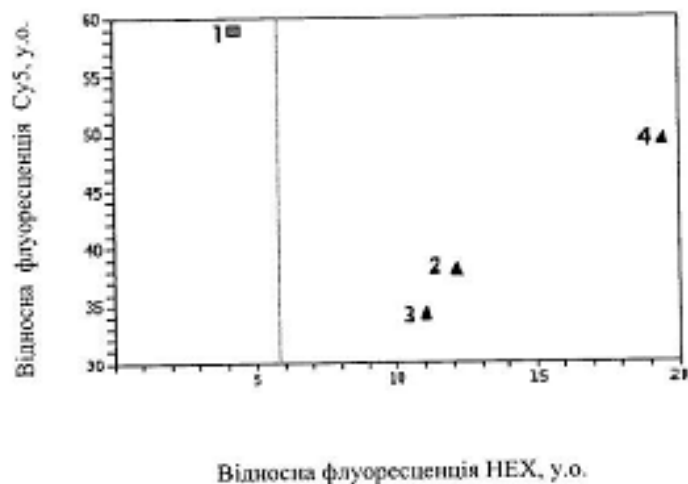
Приклад 2. Геномну ДНК хворої дитини з діагнозом муковісцидоз, а також батьків дитини та здорового брата хворого виділяли з периферійної крові з використанням протеїнази К та очищували за допомогою фенольно-хлороформної екстракції. Суміш для ампліфікації об'ємом 25 мкл містила: двократний ампліфікаційний буферний розчин з KCl (виробництво фірми Fermentas, Литва); $MgCl_2$ - 3,75 мМ; бичачий сироватковий альбумін - 170 мкг/мл; ДНТФ - 400 мкМ кожного типу; концентрація праймерів - 10 мкМ; концентрація зондів - 5 мкМ; ДНК - 1 мкг; Taq-полімераза - 0,5 од. активності на пробу. Для ампліфікації використовували систему праймерів прямий - AGTTTTCCTGGATTATGCCT; зворотній - AGTTGGCATGCTTTGATGAC та флуоресцентних зондів типу TaqMan, гомологічні послідовності без мутації - HEX-AACACCAAGATGATATT-BHQ1, та послідовності з делецією $\Delta F508$ - Cy5-GGAAACACCAATGATATT-BHQ2 за допомогою

методу ПЛР в реальному часі. Використовується двоступінчастий режим ампліфікації (95 °C - 20 с, 54 °C - 50 с) впродовж 35 циклів до досягнення ампліфікаційними кривими стадії "плато". Реєстрація флуоресцентних сигналів HEX та Cy5 відбувалася наприкінці стадії "елонгації". Результати алельної дискримінації зразків наведено на Фіг. 2. В результаті аналізу у хворої дитини було виявлено делецію $\Delta F508$ у гомозиготному стані (зразок 1), у батьків дитини (зразки 2, 4) та брата хворого (зразок 3) було виявлено $\Delta F508$ у гетерозиготному стані.

Таким чином, отримані діаграми алельної дискримінації демонструють, що запропонований спосіб діагностики делеції $\Delta F508$ є ефективним та функціонально придатним та може бути використаний для детекції даної мажорної делеції серед хворих на муковісцидоз та членів їх родин, а також для скринінгу населення.



Фіг. 1



Фіг. 2

В описі до патенту на корисну модель графічні зображення та текст подаються в редакції заявника

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

Підписне

Тираж 23 прим.

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601