



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99355** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2010 13285**
- (22) Дата подання заявки: **08.11.2010**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.08.2012**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.05.2012, Бюл.№ 9**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.08.2012, Бюл.№ 15**
- (72) Винахідник(и):
**Макух Галина Василівна (UA),
Гнатейко Олег Зіновійович (UA),
Акопян Гаяне Рубенівна (UA),
Тиркус Марта Ярославівна (UA),
Білевич Олена Борисівна (UA)**
- (73) Власник(и):
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Лисенка, 31-а, м. Львів, МСП-169,
79000, Україна (UA)**
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245:1073-1080.
Characterisation of a novel 21-kilobase-deletion, CFTRdele2,3(21kB), in the CFTR gene: a severe cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. T. Doerk, M. Macek Jr., F. Mekus et al. // Human Genetics. -2000. -Vol.106, №3. - P.259-268.
Eshaque B., Dixon B. Technology platforms for molecular diagnosis of cystic fibrosis // Biotechnol Adv. - 2006. - Vol.24, №1. -P. 86-93.
Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice / C Castellani, H Cuppens, M.Macek et al. // Journal of Cystic Fibrosis, - 2008, №7,- P. 179-196.
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Best practice guidelines for molecular genetic diagnostics of cystic fibrosis and CFTR - related disorders - updated European recommendations. Els. Dequeker, M. Stuhmann, M. Moris et al. // European Journal of Human Genetics, - 2008, - P.I - 15.
Г.В.Макух Розробка та впровадження молекулярно-генетичних методів діагностики спадкових захворювань та поширеної патології людини. [он-лайн], 2010-05-24 [знайдено 2012-05-23]. Знайдено в Інтернет: <URL: http://www.nbuv.gov.ua/portal/chem_biol/Apagki/2010_19/306-313.pdf
The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)/A/ECFS. Genoa, Italy, 19 June 2002. [он-лайн], 2004-06-18 [знайдено 2012-05-22]. Знайдено в Інтернет: <URL: http://www.cfww.org/docs/who/2002/who_hgn_cf_wg_04.02.pdf
Тихонова В.С., Мутации гена CFTR у детей с тяжелым течением бронхиальной астмы Рос. аллерг. ж.. 2011, N 6, с. 24-27. (реферат)
US20030008281 A1, 09.01.2003.
Макух Г.В. Аналіз мутацій гена cftr (ТРБМ) у хворих високого ризику муковісцидозу із західного регіону України. Автореф. Дис... канд..біол.наук. Київ - 2001.
Feldmann D. et al. [Genetic testing for cystic fibrosis: evaluation of the Elucigene CF20 kit in blood and buccal cells]. Ann Biol Clin (Paris). 2001;59 (3):277-83. (abstract)
Макух Г.В. та інш. Скринінг мутацій гена ТРБМ методом електрофорезу в денатуруючому градієнтному гелі в осіб високого ризику муковісцидозу із Західного регіону України. Біополімери і клітина. 2001; 17 (4): 319 - 324).

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПОШИРЕНИХ МУТАЦІЙ ГЕНА ТРБМ

(57) Реферат:

UA 99355 C2

Винахід належить до галузі медичної генетики і може бути використаний для детекції мутацій F508del, CFTRdele2,3(21kb), G542X та N1303K гена ТРБМ у людини, наявність яких засвідчує спадкове захворювання на муковісцидоз (МВ, CF; МКХ 10: Е 84.0) або його носійство. Спосіб діагностики мутацій гена ТРБМ включає виділення ДНК, отримання та ампліфікацію фрагментів екзонів 2, 3, 10, 11, 21 гена ТРБМ, розщеплення ендонуклеазами рестрикції, електрофоретичне розділення продуктів, фарбування та візуалізацію розділених фрагментів, при цьому здійснюють одночасне дослідження мутації F508del з CFTRdele2,3 (21kb) та мутації N1303K з G542X при одній ПЛР та на одній електрофоретичній смужі. Спосіб забезпечує точну ідентифікацію мутацій F508del, CFTRdele2,3(21kb), G542X та N1303K гена ТРБМ при зменшенні часу діагностики та зниженні вартості проведення аналізу.

Винахід належить до галузі медицини, зокрема - медичної генетики, і може бути використаний для детекції мутацій F508del, CFTRdele2,3(21kb), G542X та N1303K гена ТРБМ у людини, наявність яких засвідчує спадкове захворювання на муковісцидоз (MB, CF; МКХ 10: E 84.0, OMIM #219700).

Відомі способи діагностики мутацій гена ТРБМ ґрунтуються на виділенні ДНК та детекції мутацій з використанням комерційних наборів, таких як ELUCIGENE CF29v2, CF30, INNO-LiPA CFTR19, INNO-LiPA CFTR17+Tn, Cystic Fibrosis Genotyping Assay ((Abbott Molecular) [1]. Недоліком цього способу є необхідність спеціальних приладів і дуже висока ціна реагентів та обладнання.

Найближчим аналогом є способи діагностики цих мутацій шляхом ампліфікації фрагментів кожного із досліджуваних екзонів (чотири ПЛР), рестрикційний аналіз мутацій G542X та N1303K, гетеродуплексний аналіз для F508del, делеційний аналіз із використанням додаткової пари праймерів як внутрішній контроль при дослідженні мутації CFTRdele2,3(21kb) [2].

Недоліком аналогу є необхідність проведення чотирьох окремих молекулярно-генетичних досліджень із використанням п'яти пар праймерів.

Задачею винаходу є розробка такого способу діагностики мутацій, який би за рахунок доступних та недорогих методів дозволяв ідентифікувати мутації F508del, CFTRdele2,3(21kb), G542X та N1303K та скоротив час та витрати реагентів на проведення молекулярно-генетичного аналізу.

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі діагностики мутацій гена ТРБМ, відбувається одночасне дослідження мутації F508del з CFTRdele2,3 (21kb) та мутації N1303K з G542X при одній ПЛР та на одній електрофоретичній смузі. Спосіб забезпечує точну ідентифікацію мутацій F508del, CFTRdele2,3(21kb), G542X та N1303K при зменшенні часу діагностики та здешевленні на 50 % вартості проведення аналізу.

Для запропонованого способу аналізу придатна ДНК людини, виділена із будь-якого біологічного матеріалу. Спосіб застосовують наступним чином: для детекції мутацій F508del та CFTRdele2,3(21kb) провести мультилокусну ПЛР, із використанням двох пар праймерів - фланкуючих локус ексона 10 гена ТРБМ та гомологічних фрагментам екзонів 2 і 3 гена ТРБМ (послідовність може бути ампліфікованою лише при виникненні протяжної делеції CFTRdele2,3(21kb). Провести аналіз ПЛР-продуктів шляхом електрофорезу у 10 % ПААГ. У запропонованому способі синтез ексона 10 є внутрішнім контролем для детекції мутації CFTRdele2,3(21kb). Для детекції мутацій G542X та N1303K провести мультилокусну ПЛР, із використанням двох пар праймерів: фланкуючих локус можливих мутацій екзонів 11 й 21 гена ТРБМ. Після ампліфікації додати 2 одиниці активності ендонуклеази MvaI, проінкубувати протягом 18 год. при 37 °С, нанести проби на 2 % агарозний гель та провести аналіз ПЛР-продуктів шляхом електрофорезу.

Приклад 1

Сім'я Б. (дружина Х., 1985 р.н. та чоловік І., 1986 р.н.; проживають у с. Посада, Старосамбірського району, Львівської області) звернулися у 2009 році до Львівського міжобласного медико-генетичного центру з приводу смерті двох дітей у ранньому віці та планування вагітності. При обстеженні встановлено, що обидва партнери здорові, перша дитина померла у віці 1,5 місяця від дихальної недостатності, друга - у віці 4 днів від меконіального ілеусу. На підставі первинної підозри муковісцидозу у сім'ї була проведена молекулярно-генетична діагностика мутацій гена ТРБМ згідно запропонованого способу.

З 3 мл венозної крові пацієнтів методом висолювання виділено зразки ДНК, які отримали коди 1211 та 1212. Проводили синтез фрагментів екзонів 10 та 2,3 методом Полімеразної Ланцюгової Реакції (ПЛР) з використанням олігонуклеотидних праймерів приведеної послідовності (5'GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG CAC 3'; 5'GTT GGC ATG CTT TGATGACGC TTC 3'; 5'GAG CTT CTG AAA TTA ATT GAC CAC 3'; 5' GAA CCC ATC ATA GGA TAC AAT G 3'). 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 досліджуваних мутацій (лунка 2); контрольні зразки ДНК з мутаціями (лунки 3, 5); досліджуваний зразок ампліфікованої ДНК 1211 (лунка 4); досліджуваний зразок ампліфікованої ДНК 1212 (лунка 6). Перед зразками ДНК обов'язково наносили маркери молекулярної ваги. Електрофоретичне розділення проводили у 10 % поліакриламідному гелі (при співвідношенні акриламід до бісакриламід 29:1) з використанням трис-боратного буферу при напрузі 200 V/150 mA протягом 4 годин. Після електрофоретичного розділення гель фарбується розчином бромистого етидію (концентрація останнього складає 1 мг/л) та оцінювалися результати.

Отримані результати свідчать про те, що:

1. Ампліфікований фрагмент екзону 10 гена ТРБМ зразка 1211 (лунка 4) характеризувалися збільшеною електрофоретичною активністю у порівнянні з контрольним зразком, що передбачає присутність делеції F508del в екзоні 10 гена ТРБМ в зразку 1211. Наявність гетеродуплексних фрагментів свідчить про наявність мутації F508del, у гетерозиготному стані.

Відсутність синтезу фрагмента розміром 207 п.н. свідчить про відсутність протяжної делеції CFTRdele2,3(21kb) у зразку ДНК пацієнта.

2. Ампліфікований фрагмент екзону 10 гена ТРБМ зразка 1212 (лунка 5) не відрізнявся від контрольного зразка, що передбачає відсутність делеції F508del в екзоні 10 гена ТРБМ в зразку 1212. Наявність синтезу фрагмента розміром 207 п.н. свідчить про присутність протяжної делеції CFTRdele2,3(21kb) у зразку ДНК 1212.

Отже, в результаті проведення молекулярно-генетичної діагностики виявлено наявність мутації F508del гена ТРБМ в зразку 1211 та мутації CFTRdele2,3(21kb) у зразку ДНК 1212. Отримані результати свідчать, що обидва партнери у сім'ї Б. є гетерозиготними носіями мутацій муковісцидозу, що дозволить цій родині при застосуванні даного методу для проведення пренатальної діагностики, уникнути народження хворих дітей та мати здорове потомство.

Приклад 2

Анна П., 06.04.2004 р.н., народилася та постійно проживає у м. Нововолинськ, Волинської області. Проходила медико-генетичне консультування у Львівському міжобласному медико-генетичному центрі з приводу рецидивуючих бронхолегеневих захворювань, затримки фізичного розвитку. На підставі підозри муковісцидозу у родині була проведена молекулярно-генетична діагностика мутацій гена ТРБМ згідно запропонованого процесу.

З 3 мл венозної крові пацієнта П. та його батьків методом висолювання виділено зразки ДНК, які отримали коди 657, 658 та 659. У результаті молекулярно-генетичного дослідження мутацій F508del та CFTRdele2,3 (21kb), згідно вищенаведеного методу, встановлено відсутність даних мутацій у пробанда та його батьків. Проводили синтез фрагментів екзонів 11 та 21 методом мультилокусної ПЛР з використанням олігонуклеотидних праймерів приведеної послідовності (5'GCA GAG AAAGAC AAT ATA GTT CCT 3', 5'GCA CAG ATT CTG AGT AAC CAT AAT3', 5'CAC TCC ACT GTT CAT AGG GAT CCAG 3', 5'AAT GTT CAC AAG GGA CTC CA 3'). Обов'язковою є постановка контрольних реакцій: негативний контроль (замість ДНК додати відповідний об'єм деіонізованої води), позитивні контролю (проби ДНК із відомими мутаціями). Проводили аналіз наявності та специфічності ПЛР-продуктів шляхом електрофорезу у 2 % агарозному гелі та у випадку позитивного результату у пробірки додавали по 2 одиниці активності ендонуклеази MvaI та інкубували протягом 18 годин при 37 °C. Наносили проби на 2 % агарозний гель та проводили аналіз ПЛР-продуктів шляхом електрофорезу. При обробці рестриктазою MvaI ПЛР-продукт екзону 11 розщеплюється на фрагменти 171, 101, 23 п.н. при відсутності мутації G542X; 194, 171, 101, 23 п.н. при наявності мутації G542X у гетерозиготному стані; 194 та 101 п.н. при наявності мутації G542X у гомозиготному стані. ПЛР-продукт екзону 21 розщеплюється на фрагменти 266 та 34 п.н. при відсутності мутації N1303K; 290, 266 та 34 п.н. при наявності мутації N1303K у гетерозиготному стані; ПЛР залишається нерозщепленим (290 п.н.) при наявності мутації N1303K у гомозиготному стані. Отримані результати свідчать про те, що:

1. Наявність мутації G542X гена ТРБМ у зразках 657 та 658 та її відсутність у зразку 659.

2. Наявність мутації N1303K гена ТРБМ у зразках 657 та 659 та її відсутність у зразку 658.

Отже, в результаті проведення молекулярно-генетичної діагностики виявлено що пробанд П. є компаунд-гетерозиготою за мутаціями G542X/N1303K гена ТРБМ. Мати є гетерозиготний носій мутації G542X та батько П. - гетерозиготний носій мутації N1303K. Отримані результати верифікують діагноз муковісцидозу у пробанда та успадкування мутантних алелів від його батьків. У випадку наступних вагітностей у цій родині можливе проведення пренатальної діагностики муковісцидозу із застосуванням запропонованого методу.

Запропонований спосіб застосований при 150 дослідженнях. При цьому, в 54 випадках вдалося діагностувати наявність мутації F508del, у 12-N1303K, у 7-CFTRdele2,3(21kb), у 4-G542X, а в 73 випадках ці мутації були відсутні.

Таким чином, використання запропонованого способу дозволяє збільшити ефективність діагностики при зниженні тривалості процесу та зменшенні матеріальних видатків.

Джерела інформації:

1. Kerem B., Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245:1073-1080.

2. Characterisation of a novel 21-kilobase-deletion, CFTRdele2,3(21kb), in the CFTR gene: a severe cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. T. Doerk, M. Macek Jr., F. Mekus et al. // Human Genetics.-2000. -Vol.106, №3. -P.259-268.

3. Eshaque B., Dixon B. Technology platforms for molecular diagnosis of cystic fibrosis // Biotechnol Adv.-2006. - Vol.24, №1. -P. 86-93.

4. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice / C. Castellani, H. Cuppens, M. Macek et al. // Journal of Cystic Fibrosis, -2008, №7,-P. 179-196.

5 5. Best practice guidelines for molecular genetic diagnostics of cystic fibrosis and CFTR-related disorders-updated European recommendations. Els. Dequeker, M. Stuhmann, M. Moris et al. // European Journal of Human Genetics, -2008, - P.I-15.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

10

Спосіб діагностики мутацій гена ТРБМ, який включає виділення ДНК, отримання та ампліфікацію фрагментів екзонів 2, 3, 10, 11, 21 гена ТРБМ, розщеплення ендонуклеазами рестрикції, електрофоретичне розділення продуктів, фарбування та візуалізація розділених фрагментів, який **відрізняється** тим, що проводять одночасне дослідження мутації F508del з CFTRdele2,3 (21kb) та мутації N1303K з G542X при одній ПЛР та на одній електрофоретичній смужі.

15

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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