

Панель на основе технологии QuantStudio 12k Flex real-time PCR system для скрининга носительства мутаций гена фенилаланингидроксилазы (PAH)

Курилова О.В., Климушина М.В., Киселева А.В., Скирко О.П., Сотникова Е.А., Дивашук М.Г., Хлебус Э.Ю., Борисова А.Л., Долудин Ю.В., Сломинский П.А., Мешков А.Н., Драпкина О.М.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России
101990 г. Москва, Петроверигский пер., 10 стр.3

Целью работы было создание и апробация панели из 23 мутаций гена *PAH*, ответственных за развитие фенилкетонурии, и оценка частоты гетерозиготного носительства данных мутаций в популяционной выборке ЭССЕ-Вологда. Исследование включало 642 участника из популяционной выборки региона Вологды. Наличие мутаций в гене *PAH* определяли с помощью системы QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR. Среди 642 участников исследования было выявлено 17 носителей мутаций в гене *PAH*. Частота гетерозиготных мутаций составила 2,65% (ДИ 95%: 1,55–4,21%) или 1:38 человек. Полученные данные свидетельствуют о высокой частоте носительства мутаций гена *PAH* в российской популяции. Предложенная панель может быть использована для скрининга носительства мутаций, вызывающих фенилкетонурию.

Ключевые слова: фенилкетонурия, ген *PAH*, мутация, частота, популяционное исследование

Для цитирования: Курилова О.В., Климушина М.В., Киселева А.В., Скирко О.П., Сотникова Е.А., Дивашук М.Г., Хлебус Э.Ю., Борисова А.Л., Долудин Ю.В., Сломинский П.А., Мешков А.Н., Драпкина О.М. Панель на основе технологии QuantStudio 12k Flex real-time PCR system для скрининга носительства мутаций гена фенилаланингидроксилазы (*PAH*). *Медицинская генетика* 2020; 19(7): 71–72.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.71-72

Автор для корреспонденции: Курилова Ольга Валерьевна; e-mail: olga_kurilova81@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств Гос. задания № АААА-А18-118041790111-0.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

QuantStudio 12k flex Real-Time PCR system for screening phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene mutations

Kurilova O.V., Klimushina M.V., Kiseleva A.V., Skirko O.P., Sotnikova E.A., Divashuk M.G., Khlebus E.Yu., Borisova A.L., Doludin Yu.V., Slominsky P.A., Meshkov A.N., Drapkina O.M.

National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine
Petroverigsky per., 10, bld. 3, Moscow, 101990 Russia

The aim of the work was to create and test a custom panel of 23 *PAH* gene variants responsible for the development of phenylketonuria, and to evaluate the frequency of heterozygous carriers of these mutations among 642 participants of the population-based cohort study ESSE-Vologda. The presence of mutations was determined using QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system. 17 carriers of *PAH* variants among 642 participants were identified. The frequency of heterozygous carriers was 2.65% (CI95%: 1.55–4.21%), or 1:38. The data obtained indicate a high frequency of *PAH* variants in the Russian population. The proposed panel can be used for screening on heterozygous carriers of variants that cause phenylketonuria.

Keywords: phenylketonuria, *PAH* gene, mutation, frequency, population study

For citation: Kurilova O.V., Klimushina M.V., Kiseleva A.V., Skirko O.P., Sotnikova E.A., Divashuk M.G., Khlebus E.Yu., Borisova A.L., Doludin Yu.V., Slominsky P.A., Meshkov A.N., Drapkina O.M. QuantStudio 12k flex Real-Time PCR system for screening phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene mutations. *Medical genetics*. 2020; 19(7): 71–72. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.71-72

Corresponding author: Kurilova Olga; e-mail: olga_kurilova81@mail.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Health of the Russian Federation (theme No. АААА-А18-118041790111-0)

Conflicts of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020

Фенилкетонурия (ФКУ) — наследственное заболевание обмена веществ, связанное с нарушением метаболизма аминокислот, главным об-

разом фенилаланина. Частота гетерозиготного носительства мутаций, ассоциированных с ФКУ в РФ, составляет 3,2%, или 1:31 [1]. Частота и спектр мутаций

могут варьировать в зависимости от региона и этнической принадлежности [2]. Это делает актуальным изучение состава и частоты мутаций, вызывающих ФКУ, в различных регионах, а также поиск метода, пригодного для проведения широкого скрининга не только в семьях высокого риска, но и у людей с неотягощенным анамнезом, планирующих беременность. Целью исследования было создание и апробация панели из 23 мутаций гена *PAH*, ассоциированных с развитием ФКУ, и оценка частоты гетерозиготного носительства данных мутаций в популяционной выборке ЭССЕ-Вологда.

Материал и методы

Выборка была сделана на основе исследования «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах Российской Федерации» (ЭССЕ-РФ) из жителей Северо-Западного федерального округа России, г. Вологда в возрасте 25–64 года [3]. Исследование вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH*, вызывающих ФКУ, проводилось у 642 участников из популяционной выборки региона Вологда.

Выделение ДНК проводилось с использованием набора QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия). Концентрация ДНК определялась на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen, Германия). Панели для диагностики методом ПЦР в реальном времени были разработаны для анализа на QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США), анализ выполнялся согласно протоколу фирмы-производителя. Обнаруженный вариант подтверждался методом секвенирования по Сэнгеру на приборе Applied Biosystem 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты исследования

Для создания панели были использованы данные о частотах гетерозиготного носительства среди населения РФ, а также о частотах мутаций у больных ФКУ в городах Воронеже, Самаре, Курске, Москве, Ростовской и Московской областях и Центральном регионе России. Всего в диагностическую панель вошли 23 наиболее часто встречающихся в РФ мутации гена *PAH*, ответственные за развитие ФКУ [4]: R408W (rs5030858), A403V (rs5030857), Y414C (rs50308), A300S (rs5030853), IVS12+1G>A (rs5030861), R261Q (rs5030849), IVS10-11G>A (rs5030855), R158Q (rs5030843), P281L (rs5030851), L48S (rs5030841), R252W (rs5030847), R243X (rs5030846), S349P (rs62508646), IVS2+5G>C (rs62507288), E280K (rs62508698), IVS4+5G>T (rs62507321), R243Q (rs62508588), R111X (rs76296470), I306V (rs62642934), c.47_48delCT (rs62642906), c.664_665delGA (rs62514936), R261X (rs5030850), EX5del. В результате исследования среди 642 участников выявлено 17 гетерозиготных носителей мутаций в гене *PAH*. Из 23 исследуемых мутаций вызывающих ФКУ, выявлено шесть: R408W (rs5030858) 1,56%, A403V (rs5030857) 0,31%, I306V

(rs62642934) 0,31%, L48S (rs5030841) 0,16%, IVS12+1G>A (rs5030861) 0,16%, R261Q (rs5030849_C_T) 0,16%. Таким образом, суммарная частота мутаций по гену *PAH* составила 2,65 % или 1:38 человек.

Таким образом, в результате исследования была разработана панель для выявления гетерозиготного носительства мутаций гена *PAH*. Полученные данные свидетельствуют о высокой частоте носительства мутаций гена *PAH* в российской популяции. Предложенная панель на основе технологии QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System позволяет быстро получить результат и может быть использована для скрининга носительства мутаций, вызывающих ФКУ.

Литература

1. Абрамов Д.Д., Кадочникова В.В., Якимова Е.Г., Белоусова М.В., Маерле А.В., Сергеев И.В., Рагимов А.А., Донников А.Е., Трофимов Д.Ю. Высокая частота носительства в российской популяции мутаций гена *CFTR*, ассоциированных с муковисцидозом, и мутаций гена *PAH*, ассоциированных с фенилкетонурией. *ВЕСТНИК РГМУ* 2015; 4: 32–35.
2. Blau N., Shen N., Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14(6): 655–671. DOI:10.1586/14737159.2014.923760.
3. Научно-организационный комитет проекта ЭССЕ-РФ. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России (ЭССЕ-РФ). Обоснование и дизайн исследования. *Профилактическая медицина* 2013; 16(6): 25–34.
4. Никифорова А.И., Абрамов Д.Д., Кадочникова В.В., Зобкова Г.Ю., Огурцова К.А., Брюханова Н.О., Шестопалова Е.А., Кочеткова Т.О., Шубина Е.С., Донников А.Е., Трофимов Д.Ю. Определение частоты встречаемости мутаций в гене *PAH* с применением комбинации технологий ПЦР «в реальном времени» и высокопроизводительного секвенирования у больных Фенилкетонурией Московского региона. *ВЕСТНИК РГМУ* 2017; 4: 42–49.

References

1. Abramov D.D., Kadochnikova V.V., Yakimova E.G., Belousova M.V., Maerle A.V., Sergeev I.V., Ragimov A.A., Donnikov A.E., Trofimov D.Yu. Vysokaya chastota nositel'stva v rossiyskoy populyatsii mutatsiy gena CFTR, assotsiirovannykh s mukovistsidozom, i mutatsiy gena PAH, assotsiirovannykh s fenilketonuriyey. [High carrier frequency of CFTR gene mutations associated with cystic fibrosis, and PAH gene mutations associated with phenylketonuria in the Russian population]. *VESTNIK RGMU [Bulletin of RSMU]* 2015; 4: 32–35. (In Russ.)
2. Blau N., Shen N., Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14(6): 655–671. DOI:10.1586/14737159.2014.923760.
3. Research Organizing Committee of the ESSE-RF project. Epidemiologiya serdечно-sosudistykh zabolevaniy v razlichnykh regionakh Rossii (ESSE-RF). [Epidemiology of cardiovascular diseases in different regions of Russia (ESSE-RF). The rationale for and design of the study]. *Profilakticheskaya meditsina [Preventive Medicine]* 2013; (6): 25–34. (In Russ.)
4. Nikiforova A.I., Abramov D.D., Kadochnikova V.V., Zobkova G.Yu., Ogurtsova K.A., Bryukhanova N.O., Shestopalova E.A., Kochetkova T.O., Shubina E.S., Donnikov A.E., Trofimov D.Yu. Opredeleniye chastoty vstrechayemosti mutatsiy v geneyе RAN s ispol'zovaniyem razlichnykh tekhnologiy PTCR i vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovaniya bol'nykh Fenilketonuriyey Moskovskogo regiona. [Determining the frequency of PAH mutations in Moscow region residents with phenylketonuria using a combination of Real-Time PCR and Next-Generation Sequencing]. *VESTNIK RGMU [Bulletin of RSMU]* 2017; 4: 42–49. (In Russ.)