

# Олигонуклеотидный биочип для диагностики 3-м синдрома, SOPH-синдрома, тирозинемии 1 типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии 1 типа, наследственной несиндромальной глухоты 1а типа

Саввина М.Т., Сухомямова А.Л., Голикова П.И., Данилова А.Л., Максимова Н.Р.

ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова»  
677000, г. Якутск, ул. Белинского, д 58

**Актуальность.** В популяции якутов Республики Саха (Якутия) по данным ряда авторов наблюдается значительное накопление наследственных заболеваний. Частота некоторых заболеваний выше, чем в России и мире. В республике стоит необходимость проведения мероприятий по снижению генетического груза путём проведения скрининга населения. Существующие в настоящее время методы генетической диагностики имеют ограничения из-за ресурсозатратности и продолжительного времени проведения одного анализа. Одним из перспективных методов ДНК-диагностики, позволяющим одновременно проводить определение нескольких точковых мутаций, является анализ на биочипах, имеющий высокую скорость проведения исследования и высокую достоверность получаемых результатов.

**Цель работы** – разработка способа одновременной детекции носительства мутаций частых наследственных заболеваний у населения якутской этнической группы с использованием ДНК-биочипа.

**Методы.** Для формирования диагностической панели биочипа были проанализированы научная литература и генетический регистр наследственных болезней МГЦ НЦМ РБ №1. Синтетические олигонуклеотиды наносились на стеклянную подложку биочипа бесконтактным способом печатающей станцией *Perkin Elmer Piezzorray (Perkin Elmer, США)*. Диагностика на биочипе основана на реакции обратной гибридизации и включает два этапа мультиплексной ПЦП с наработкой флуоресцентно-меченых одноцепочных продуктов с последующей их гибридизацией с мишенями на подложке. Верификация результатов генотипирования на биочипе проводилась методами ПЦП-ПДРФ и ПЦП в реальном времени.

**Результаты.** Нами разработан ДНК-биочип для выявления мутаций в генах *CUL7, NBAS, FAH, DIA1* и *GJB2*, которые являются причиной возникновения пяти наследственных болезней: 3-М синдрома, SOPH-синдрома, тирозинемии 1 типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии I типа, наследственной несиндромальной глухоты 1А типа соответственно. Были проведены испытания экспериментальных образцов биочипов, а также сравнение полученных данных с результатами ДНК-диагностики исследуемых наследственных заболеваний на той же выборке образцов классическими методами. На данный способ диагностики получен Патент РФ «Способ одновременной диагностики наследственных заболеваний» №2627115 от 03.08.2017 г.

**Ключевые слова:** наследственные заболевания, якуты, точковые мутации, гетерозиготное носительство, диагностический биочип, синтетические олигонуклеотиды, 3-М синдром, SOPH-синдром, тирозинемия 1 типа, метгемоглобинемия 1 типа, несиндромальная глухота 1 типа.

**Для цитирования:** Саввина М.Т., Сухомямова А.Л., Голикова П.И., Данилова А.Л., Максимова Н.Р. Олигонуклеотидный биочип для диагностики 3-М синдрома, SOPH-синдрома, тирозинемии 1 типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии 1 типа, наследственной несиндромальной глухоты 1А типа. *Медицинская генетика* 2019; 18(9):24-33

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2019.09.24-33

**Автор для корреспонденции:** Саввина Мира Тауржановна, e-mail: mira@savv.in

**Финансирование.** «Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» № 14.575.21.0015.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

**Поступила:** 20.08.2019

## Oligonucleotide microarray based method for simultaneous diagnostic of 3-M syndrome, SOPH syndrome, tyrosinemia type 1, methaemoglobinaemia type 1, nonsyndromic hearing loss and deafness (DFNB1)

*Savvina M.T., Sukhomyamova A.L., Golikova P.I., Danilova A.L., Maksimova N.R.*

North-Eastern Federal University  
Belinsky str. 58, 677027 Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia

**Background and objectives.** High incidence and high prevalence of hereditary diseases in Yakut ethnic group of Republic of Sakha (Yakutia) has been reported by several research groups. The incidence of some of the diseases are much higher comparing

to data in other regions of Russia and the worldwide. There is a pressing need for prevention of those diseases through the mass genetic screening of population. The methods of genetic diagnostics that are known today are not able to afford the mass screening due to the high cost and time consumption for a single test. One of promising technologies and methods of DNA diagnostics is DNA microarray. It enables researchers to quickly screen large numbers of biological analytes for a variety of purposes including disease diagnostics.

**Methods.** A *Perkin Elmer Piezzorray (Perkin Elmer)* microarrayer was used to print oligonucleotide based low-density microarrays by non-contact manner for addressing 5 mutations causing 5 frequently occurring diseases reported from yakut population. The assay using developed microarray chip based on reverse hybridization which include two step multiplex PCR reactions with production of one-stranded Cy5 labeled-PCR products following its hybridization with oligonucleotide probes.

**Results.** In this study we developed a DNA microarray for detection of mutations in genes *CUL7*, *NBAS*, *FAH*, *DIA1*, *GJB2* genes which are known to be cause of five very frequently occurring hereditary diseases in republic of Sakha (Yakutia): 3-M syndrome, SOPH-syndrome, tyrosinemia type 1, methaemoglobinaemia type 1, nonsyndromic hearing loss and deafness (DFNB1) type 1A respectively. Testing of experimental versions of DNA chips as well as control DNA diagnostic of five hereditary diseases on the same DNA samples using PCR with PCR and restriction enzyme analysis and real-time PCR were carried out.

**Keywords:** inherited diseases, Yakuts, point mutatiois, heterozygous carriage, DNA-microarray, diagnostics, synthesized oligonucleotides, 3-M syndrome, SOPH syndrome, tyrosinemia type 1, methaemoglobinaemia type 1, nonsyndromic hearing loss and deafness (DFNB1) type 1A.

**For citation:** Savvina M.T., Sukhomyamova A.L., Golikova P.I., Danilova A.L., Maksimova N.R. Oligonucleotide microarray based method for simultaneous diagnostic of 3-M syndrome, SOPH syndrome, tyrosinemia type 1, methaemoglobinaemia type 1, nonsyndromic hearing loss and deafness (DFNB1). *Medical genetics* 2019; 18(8): 24-33 [In Rus]

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2019.09.24-33

**Corresponding author.** Savvina Mira Tairzhanovna, e-mail: mira@savv.in

**Funding.** The special federal program «The investigation and developments on priority course of science and technology development of Russian Federation for 2014-2020».

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 20.08.2019

## Введение

**В** популяции якутов Республики Саха (Якутия) наблюдается высокая распространенность наследственных заболеваний, которые редко встречаются в других популяциях и обусловлены мажорными мутациями в генах [1–3]. Частота встречаемости гетерозиготного носительства мутаций, вызывающих данные заболевания у якутов, в зависимости от заболевания составляет от 1 до 11 % [2, 15]. В табл. 1 представлены примеры некоторых редких в мире наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, выявленных с высокой частотой в последние годы в Республике Саха (Якутия). К этим заболеваниям относятся:

- 3-M синдром (OMIM #273750), для которого характерны дистресс-синдром при рождении, пренатальная гипоплазия, низкий рост (120-130 см у взрослых), лицевые дизморфии, короткая шея, короткая и широкая грудина, брахидактилия, микромелия кистей и стоп, выступающие пятки, нормальный интеллект, низкая частота рентгенологической патологии костной системы. В Якутии заболевание встречается с частотой 10 на 100 000 якутов, вызывается мутацией

4582\_4583insT в гене *CUL7*. Частота гетерозиготного носительства мутации составляет в среднем 3% [4, 5];

- SOPH-синдром (OMIM #614800), для которого характерны низкий рост (ниже 150 см) с пропорциональным телосложением, нормальный вес и рост при рождении, отставание в росте с 6 месячного возраста, брахицефальная форма головы, узкое длинное лицо со старческим выражением, маленькие черты лица с легким экзофтальмом, короткая шея, сниженный тургор кожи, старческая дряблая кожа, микромелия верхняя и нижняя, широкие стопы, атрофия зрительных нервов, дистрофия колбочек сетчатки, частые простудные заболевания, пельгеровская аномалия лейкоцитов, сохранный интеллект. В Якутии заболевание встречается с частотой 9,95 на 100 000 якутов, вызывается мутацией с.5741G>A в гене *NBAS*. Частота гетерозиготного носительства мутации составляет в среднем 1% [6, 7];

- наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия 1A типа (OMIM #250800), которая проявляется цианозом кожных покровов и слизистых, одышкой, головной болью, умственной отсталостью. В Яку-

тии заболевание встречается с частотой 14,9 на 100 000 якутов, вызывается мутацией с.806С>Т в гене *DIA1*. Частота гетерозиготного носительства мутации составляет в среднем 5,5% [8, 9];

- тирозинемия 1А типа (ОМIM #276700), которая относится к нарушениям аминокислотного обмена (аминоацетилкопатаии) и обусловлена недостаточностью фумарилацетонацетат гидролазы, приводящей к тяжелой патологии печени и почек. В мире заболевание встречается с частотой 1 на 100 000 населения, вызывается мутацией с.1090G>C в гене *FAH*. Частота гетерозиготного носительства мутации в Якутии составляет в среднем 1% [10];

- наследственная несиндромальная глухота 1А типа (ОМIM #220290). В якутской популяции заболевание встречается с частотой 16,2 на 100 000 якутов, в основном вызывается мутацией с.-23+1G>A в гене *GJB2*. Частота гетерозиготного носительства этой мутации составляет в среднем 11,7% [11, 12].

Учитывая изложенное, важной задачей является снижение частоты перечисленных наследственных болезней путём проведения массового скрининга населения для выявления гетерозиготных носителей мутаций с последующими медико-генетическим консультированием и пренатальной диагностикой, который уже внедрен в Канаде [13]. Такая форма профилактики показала свою эффективность, снизив частоту встречаемости β-талассемии, серповидно-клеточной анемии на 70% в популяциях Средиземноморья, на 90% заболеваемость болезнью Тея-Сакса у еврейского населения в Соединенных Штатах Америки и в Канаде [14].

Широкое внедрение ДНК-диагностики в медицинскую практику будет способствовать улучшению показателей здоровья и качества жизни населения. В настоящее время для выявления вышеперечисленных генетических заболеваний используются классические методы, основанные на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ анализе) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, что является трудоемким и ресурсозатратным.

Успешно зарекомендовала себя технология биочипов, позволяющая одновременно проводить анализ сразу нескольких точковых мутаций, что намного повышает чувствительность анализа и снижает его трудоемкость и стоимость, и дает возможность клинико-диагностическим лабораториям тестировать десятки и сотни образцов одновременно [16, 17].

Для клинических исследований наиболее подходящим является биочип невысокой плотности. Одним из примеров является биочип для выявления наследственных болезней у евреев-ашкенази [18, 19]. В России в Институте молекулярной биологии РАН разрабо-

тан ряд биочипов для анализа генетических изменений у человека при различных заболеваниях, предназначенных для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации, ренин-ангиотензиновой системы и генах гемостаза [20]. Группой компаний «Алкор Био» была разработана тест-система для выявления мутаций в гене *CFTR* «Муковисцидоз-биочип» [21, 22]. При патентном поиске способов одновременной диагностики частых в популяции якутов наследственных заболеваний: 3-М синдрома, SOPH-синдрома, тирозинемии 1 типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии I типа, наследственной несиндромальной глухоты 1А типа с использованием биочиповых технологий выявлено не было.

Таким образом, целью нашей работы явилась разработка тест-системы на основе биочипа низкой плотности, позволяющей проводить ДНК-диагностику пяти часто встречающихся моногенных заболеваний у населения Республики Саха (Якутия): 3-М синдрома, SOPH-синдрома, тирозинемии 1 типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии I типа, наследственной несиндромальной глухоты 1А типа. Использование тест-системы на основе биочипа для ДНК-диагностики данных заболеваний предполагает проведение двухэтапной ПЦР (с использованием флуоресцентно меченых праймеров во второй ПЦР), гибридизацию полученного продукта на подложке, считывание биочипа на флуоресцентном сканере.

Была разработана экспериментальная партия биочипов для последующего их испытания, а также была проведена контрольная ДНК-диагностика исследуемых наследственных заболеваний на той же выборке образцов ДНК методами ПЦР-ПДРФ и ПЦР в реальном времени.

### Методы

Для формирования списка мутаций были проанализированы научная литература и «Республиканский генетический регистр наследственной и врожденной патологии Медико-генетического центра Национального центра медицины-Республиканской Больницы №1».

#### *Крепление мишеней на подложке биочипа*

Олигонуклеотидные мишени и праймеры для двух этапов ПЦР были синтезированы по нашему дизайну индустриальным партнером ООО «Вега» группы компаний «Алкор Био».

В качестве подложки биочипа использовалось предметное стекло размером 75x25 мм с низким уровнем флуоресценции (АпексЛаб, Россия), активиро-

ванное 3-аминопропил-триэтоксиланом (APTES) и модифицированное глутаровым альдегидом (GA) для крепления на нем мишеней. В качестве мишеней были использованы синтетические олигонуклеотиды, модифицированные аминогруппой, комплементарные участкам ампликонов, получаемых в ходе второго этапа ПЦР. Мишени подбирались в соответствии с участком ДНК с искомой мутацией, а также с нормальной последовательностью данного гена. Последовательности мишеней приведены в табл. 2. Мишени наносились на активированную подложку бесконтактным способом печатающей станцией *Perkin Elmer Piezzorray* (*Perkin Elmer*, США) согласно топологической схеме (рис. 1а). Буфер для печати готовился на основе фосфатного буфера (рН 8) с глицерином (40–50%) и бромфенолом (0,0001%). Содержание мишеней составляло 1–2 пикомоль/мкл. Печать мишеней велась согласно технической документации печатающей

станции. На заключительном этапе чипы с нанесёнными мишенями обрабатывались 0,1% раствором боргидрида натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) в течение 3 минут при комнатной температуре для восстановления связей в основании Шиффа от двойных до одинарных –  $\text{NH-SH}$ -, что повышает стабильность иммобилизации мишеней на подложке. Один биочип рассчитан на тестирование одного образца по пяти мутациям.

Методики крепления мишеней на подложке биочипа, а также проведения диагностики на тест-системе соответствовали ранее разработанной и запатентованной ООО «Вега» группы компаний «Алкор Био» тест-системе для выявления мутаций в гене *CTFR* «Муковидоз-биочип» [21, 22].

#### Дизайн праймеров и мишеней

Дизайн мишеней для биочипа был осуществлён с учетом классических правил комплементарности таким

Таблица 1.

#### Распространенность редких наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования и частота гетерозиготного носительства среди якутов

Название заболевания (ОМIM)	Распространенность среди якутов / в мире	Ген	Мажорная мутация	Частота гетерозиготного носительства мутации, %	Литературные источники
3-М синдром (#273750)	10:100 000	<i>CUL7</i>	4582_4583insT	3	[4, 5]
SOPH-синдром (#614800)	9,95:100 000	<i>NBAS</i>	c.5741G>A	1,0	[6, 7]
Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия 1 типа (#250800)	14,9:100 000	<i>DIA1</i>	c.806C>T	5,5	[8, 9]
Тирозинемия 1 типа (#276700)	1:100 000	<i>FAH</i>	c.1090G>C	1,0	[10]
Наследственная несиндромальная глухота 1А типа (#220290)	16,2:100 000	<i>GJB2</i>	c.-23+1G>A	11,7	[11, 12]

Таблица 2

#### Структура мишеней на подложке биочипа

Название	Тип мишени	Последовательность (5'→3')
<i>CUL7</i>	Нормальный	NH2-CGTCTCAAAAGAAAAAAAAAAGGTA
<i>CUL7</i>	Мутантный	NH2-CGTCTCAAAAGTAAAAAAAAAAGGTA
<i>NBAS</i>	Нормальный	NH2-TGGAAGCCCCTAAAGAG
<i>NBAS</i>	Мутантный	NH2-TGGAAGCCCATAAAGAG
<i>DIA1</i>	Нормальный	NH2-AGGAGGAGCCGCTGGTGCTG
<i>DIA1</i>	Мутантный	NH2-AGGAGGAGCTGCTGGTGCTG
<i>FAH</i>	Нормальный	NH2-GCTCCATGTTGGAAGTGCCTGG
<i>FAH</i>	Мутантный	NH2-GCTCCATGTTGCAAGTGCCTGG
<i>GJB2</i>	Нормальный	NH2-CCCGACGCAGGTGAGCCCGC
<i>GJB2</i>	Мутантный	NH2-CCCGACGCAGATGAGCCCGC

образом, чтобы обеспечить специфичное связывание (гибридизацию) с флуоресцентно меченным продуктом, полученным после второго этапа ПЦР. Для дизайна праймеров был осуществлен поиск последовательностей заданных генов в базе нуклеотидных последовательностей NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Из последовательностей генов были отобраны участки, фланкирующие область с предполагаемой мутацией. В каждой паре праймер, содержащий флуоресцентную метку и добавляемый в молярном избытке по отношению ко второму праймеру, составляющему ту же пару, выбирался из той цепи, последовательность которой комплементарна последовательностям иммобилизованных на биочипе олигонуклеотидных мишеней. Структуры праймеров представлены в **табл. 3**.

### Контроль качества смеси праймеров двух этапов ПЦР

Контроль качества смеси праймеров первого этапа ПЦР проводился методом проведения первой реакции амплификации отдельно с положительным и отрицательным контролями (в роли последнего использовалась вода) и электрофоретическим разделением продуктов в 3% агарозном геле. Результаты электрофореза анализировались с использованием гель-документирующей станции (BioRad, США). Критериями качества являлись: ожидаемый размер продукта ПЦР соответствовал исследуемым генам, отсутствие сигналов в отрицательном контроле.

Для проведения контроля качества смеси праймеров второго этапа ПЦР был включен процесс гибридизации, состоящий из двух этапов: амплификации и гибридизации, согласно схеме проведения ДНК-диагностики на тест-системе. Контроль качества опирался на следующие критерии: 1) для положительного контроля все сигналы в поле нормального типа должны присутствовать, за исключением гомозиготной мутации, где сигнал присутствует только в поле мутации; 2) для отрицательного контроля не должно быть положительных сигналов, кроме сигналов контрольной полосы.

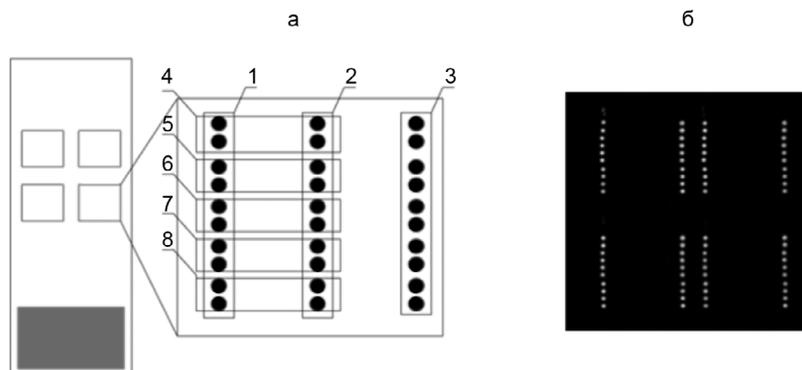
### Схема проведения диагностики на тест-системе

#### 1. Отбор проб.

В качестве биологического материала использовалась геномная ДНК, выделенная классическим методом хлороформной экстракции из венозной крови. Также допускается использование пятна сухой крови на фильтровальной бумаге и буккального соскоба.

#### 2. Синтез меченых зондов.

Синтез меченых зондов для формирования гибридов с мишенями производился посредством двух стадий мультиплексной ПЦР с использованием пяти пар праймеров, позволяющих амплифицировать участки ДНК, содержащие сайты мутаций, ответственных за развитие всех пяти заболеваний (**табл. 3**). Используются буфер для ПЦР с 3 мМ  $Mg^{2+}$  и 0,2 мМ каждого dNTP – 107 мкл, HS Taq-ДНК-полимераза – 2,8 мкл



**Рис. 1.** Схема биочипа и сканированное изображение продуктов гибридизации на образце нормального типа. Обозначения: а – топологическая схема биочипа; 1 – набор 5 мишеней в дубликатах нормального типа; 2 – набор 5 мишеней в дубликатах мутантного типа, 3 – набор контрольных мишеней; 4 – мишени для детекции мутации 4582insT в гене *CUL7* (нормальный и мутантный тип); 5 – мишени для детекции мутации 5741G/A в гене *NBAS* (нормальный и мутантный тип); 6 – мишени для детекции мутации 1090G>C в гене *FAH* (нормальный и мутантный тип); 7 – мишени для детекции мутации P269L в гене *DIA1* (нормальный и мутантный тип); 8 – мишени для детекции мутации IVS1+1G>A в гене *GJB2* (нормальный и мутантный тип); б – сканированное изображение продуктов гибридизации образца дикого типа.

(все реактивы от Евроген, Россия), тестируемая геномная ДНК — 10 мкл. Реакции проводились в следующем режиме: предварительная денатурация при 96°C 15 мин, затем 40 циклов амплификации по следующей схеме: 96°C 2 сек, 64°C 10 сек, 72°C 5 сек. Второй этап ПЦР проводился в реакционной смеси того же состава, но с избытком праймеров для преимущественной наработки флуоресцентно меченого одноцепочного ПЦР-продукта. Флуоресцентное мечение происходило на втором этапе ПЦР в амплификации одноцепочных фрагментов ДНК с флуоресцентной меткой. В качестве флуоресцентной метки использовался краситель Cy5-dUTP. Матрицей являлся ПЦР-продукт первого этапа ПЦР.

### 3. Проведение реакции гибридизации.

Одноцепочные, флуоресцентно меченые продукты второго этапа ПЦР наносились на поверхность биочипа для формирования гибридов, специфично связанных ковалентной связью комплементарных участков ампликона и мишеней на биочипе с использованием 10 мл гибридизационного буфера (1M GuSCN, 50 mM NEPEP, pH 7,5, 5 mM ЭДТА, pH 7,0; ООО «АлкорБио», Россия). Биочип был помещен в гибридизационную камеру, затем в камеру были внесены 4 мл гибридизационного буфера, содержащего амплификат второго этапа ПЦР. Реакция происходила в условиях водяной бани при температуре 49°C в течение 1 часа. После гибридизации биочип промывался в деионизированной воде для удаления неспецифично связанных продуктов, затем сушился при комнатной температуре.

### 4. Обработка результатов анализа.

Визуализация флуоресцентных сигналов с гибридизованных на биочипе ампликонов производилась на сканере Scan Ri, (Perkin Elmer, США).

### 5. Интерпретация результатов.

Для анализа результатов использовался персональный компьютер с программой, разработанной производителем сканера, с индивидуально заданными параметрами. Для снижения вероятности ошибки поле анализа представлено на биочипе в четырех повторях. В схеме мишеней обозначены (рис. 1): 1 — поле, содержащее мишени дикого типа, 2 — поле, содержащее мишени нормы, 3 — контрольная полоса, 4 — 3-М синдром, 5 — SOPH-синдром, 6 — метгемоглобинемия 1 типа, 7 — наследственная несиндромальная глухота 1А типа, 8 — тирозинемия 1 типа. При этом все мишени нанесены в вертикальных дублях.

### Проведение контрольной ДНК-диагностики на наличие искомых мутаций методами ПЦР-ПДРФ и ПЦР с регистрацией сигнала в конечной точке

Для подтверждения достоверности результатов, полученных в ходе тестирования партии изготовленных биочипов, был проведен анализ методом ПЦР с рестрикционным анализом и детекцией методом гель-электрофореза на наличие мутаций, вызывающих тирозинемия 1А типа, метгемоглобинемия 1 типа и несиндромальную глухоту 1А типа. Праймеры были закуплены у компании «Евроген», были использованы эндонуклеазы рестрикции HpyCH4, Alu I, Hph I (Хе-

Таблица 3

Последовательности праймеров для первого и второго этапов ПЦР

Название заболевания	Последовательность праймеров для 1 этапа ПЦР	Последовательность праймеров для 2 этапа ПЦР
3-М синдром	F CCCTCAGCTTGCAGGTACGTCTGA	F CCCTCAGCTTGCAGGTACGTCTGA
	R AAGGATATCCAGGAGGTATGCACT	R Cy5- TCTCCACTGAGTGAGTGATCAGCAT
SOPH-синдром	F TTGTTCTAACTCATTAACACTTGCTGAAT	F TTGTTCTAACTCATTAACACTTGCTGAA
	R TCTTGAGCTTCGTCTTCTGAGTTTCTT	R CY5- GTCTTAATAGCCTTTCT
Наследственная несиндромальная глухота 1А типа	F CAGGACCCGCTAGGAGCGCAGGA	F CCGCGCTTCCCTCCGACGCAG
	R GCCGGGCAACCGCTCTGGGTCTC	R CY5-GCCGGGCAACCGCTCTGGGTCTC
Метгемоглобинемия 1 типа	F CCACACGTCAGCTTACCTGGTCTCTC	F TTCGTGAATGAGGAGATGATCCGGG
	R CGTGCCCGGCCCTCAGAAGACGAAGC	R CY5-GGGAAGGCAGGCGTACTGGATCATG
Тирозинемия 1 типа	F GGAGCCAGAAAACCTTCGGCTCCATG	F GGAGCCAGAAAACCTTCGGCTCCATG
	R CCTCACCTGTTATGATGACTTCATC	R CY5- CAGCAGAAAACCTTCGGTCTGACCAT

ликон, Россия). ПЦР проводилась на амплификаторе «С1000 Touch» (BioRad, США) в следующих режимах:

- выявление мутации 1090G>C в гене *FAH*: денатурация при 95°C 3 мин, затем 35 циклов по следующей схеме: 94°C 30 сек, 53°C 30 сек, 72°C 30 сек, 72°C 5 мин.
- выявление мутации P269L в гене *DIA1*: денатурация при 96°C 2 мин, 32 цикла по следующей схеме: 96°C 1 мин, 56°C 1 мин, 72°C 1 мин, 72°C 30 мин.
- выявление мутации IVS1+1G>A в гене *GJB2*: денатурация при 95°C 3 мин, 34 цикла по следующей схеме: 94°C 30 сек, 55°C 30 сек, 72°C 30 сек, 72°C 5 мин.

Рестрикция проводилась в режиме, соответствующем требованиям и условиям работы каждой рестриктазы. Полученные после рестрикции фрагменты регистрировались методом гель-электрофореза в 4% агарозном геле с использованием аппарата «PowerPack Basic» (BioRad, США). Интерпретация результатов электрофореза проводилась путем соотнесения длин фрагментов известным по протоколу значениям.

Для проведения диагностики носительства мутаций, вызывающих 3-М синдром и SOPH-синдром, была использована ПЦР с регистрацией сигнала в конечной точке. Для проведения диагностики использовались наборы реагентов для генотипирования маркера 4582 insT гена *CUL7* (3-М синдром) и полиморфного маркера G5741→A (R1914H) в 45-м экзоне гена *NBAS* (SOPH-синдром) (Тестген, Россия). Анализ проводился с использованием амплификатора «CFX» (BioRad, США) в соответствии с протоколом производителя наборов реагентов в следующем режиме: первая денатурация 95°C 2 мин, 40 циклов в режиме: 94°C 10 сек, 60°C 1 мин.

## Результаты и обсуждение

С целью изучения распространенности моногенных заболеваний и спектра мутаций в якутской этнической группе населения Республики Саха (Якутия) были проанализированы научная литература и генетический регистр наследственных болезней МГЦ НЦМ РБ №1. На основании результатов генетико-эпидемиологических исследований и информации регистра были отобраны мутации, отвечающие за возникновение пяти наиболее распространенных моногенных заболеваний с рецессивным типом наследования, которые были включены в диагностическую панель биочипа: 4582\_4583insT в гене *CUL7*, с.5741G>A в гене *NBAS*, с.806C>T в гене *DIA1*, с.1090G>C в гене *FAH*, с.-23+1G>A в гене *GJB2*, вызывающие 3-М синдром, SOPH-синдром, наследственную энзимопеническую метгемоглобинемию 1 типа, тирозинемию 1 типа, наследственную несиндромальную глухоту 1А типа, соответственно. Основными критериями отбора являлись

частота встречаемости (носительства) и тип мутации, подходящий по техническим требованиям для создания биочипа: мутация должна быть точковой.

Тест-система основана на принципе обратной гибридизации флуоресцентно меченых зондов, где мишенью является синтетический олигонуклеотид, а зондом — флуоресцентно меченый продукт [20]. Биочип разделен на четыре эквивалентных поля (**рис. 1а**). Каждое поле содержит пять наборов мишеней: нормальные аллели, мутантного типа и контрольную полосу по мутациям, соответствующим пяти наследственным заболеваниям: 3-М синдрому (мишени №1, 2), SOPH-синдрому (мишени №3, 4), тирозинемию 1 типа (мишени № 5, 6), наследственной энзимопенической метгемоглобинемию 1 типа (мишени № 7, 8), наследственной несиндромальной глухоте 1А типа (мишени № 9, 10) как показано в **табл. 2**. Мишени в каждом поле дублируются.

Изготовленные биочипы, успешно прошедшие контроль качества на производственной базе ООО «Алкор Био», были задействованы в испытании и оптимизации методики ДНК-диагностики.

Первоначальными задачами были определение оптимальной концентрации пар праймеров и проведение контроля качества смеси праймеров для первого этапа ПЦР с использованием электрофоретического разделения продуктов ПЦР. По интенсивности сигналов на агарозном геле после электрофореза были выбраны пары праймеров в следующих количествах: *CUL7* (203 п.н.) 0,8 пмоль, *NBAS* (185 п.н.) 2 пмоль, *DIA* (220 п.н.) 0,8 пмоль, *GJB2* (284 п.н.) 8 пмоль, *FAH* (125 п.н.) 8 пмоль (**рис. 2**).

Для проверки качества ампликонов проводился второй этап биочиповой ДНК-диагностики — гибридизация, при которой комплементарные последовательности ампликонов и генетических маркеров на биочипе образуют гибриды, и специфически связанные ампликоны с флуоресцентной меткой должны оставаться на слайде и по схеме (**рис. 1**) должны определяться сигналы с каждого ампликона. В качестве примера использовались ПЦР-продукты с мутантными аллелями генов *CUL7* и *GJB2* (**рис. 3 а, б**) и образец нормы (**рис.1 б**). На **рис. 3 а** изображен результат сканирования с ПЦР продуктом с мутантным аллелем *CUL7* (3-М синдром). Первая полоса на рисунке является полем нормы. Как видно на рисунке, в ней отсутствуют первые две точки сверху (по схеме, соответствующие точкам нормы для гена *CUL7*), и справа параллельно от него визуализируются две другие точки, топографически соответствующие отсутствующим аллелям гена *CUL7*. Эти точки являются точками мутантного поля, по топологии, соответствующие мутантным аллелям

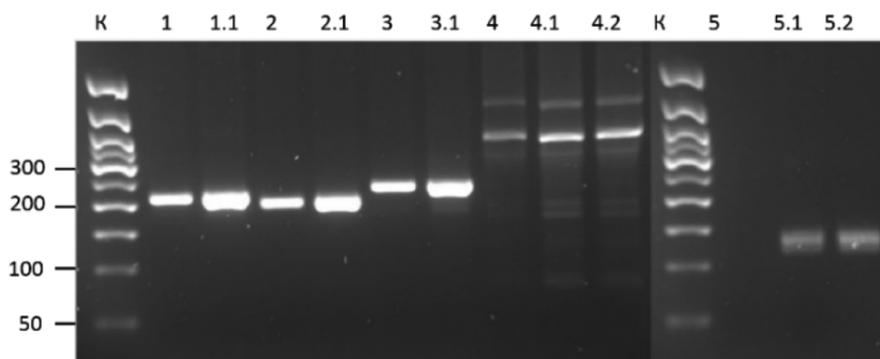
гена *CUL7*. Аналогичные результаты показаны на рисунке 3к, но уже для мутации в гене *GJB2*, отвечающей за возникновение врожденной глухоты. Согласно рисунку, все точки дают сигнал соответственно их топологическому размещению.

Таким образом, были утверждены окончательный набор пар праймеров по каждой точке, их оптимальная концентрация, а также температурно-временной режим постановки ПЦР.

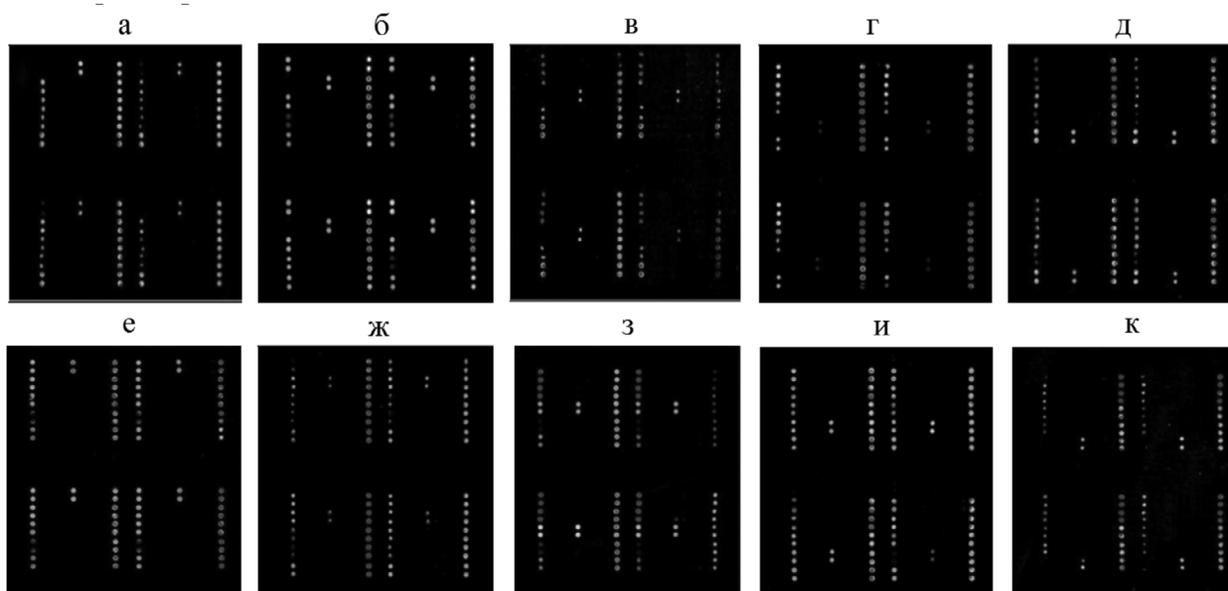
Были проведены апробация тест-системы на образцах ДНК пациентов с известным генотипом из банка ДНК МГЦ НЦМ-Республиканская больница

№1, а также контрольная ДНК-диагностика методами ПЦР-ПДРФ и ПЦР в реальном времени для верификации результатов генотипирования. Результаты, полученные методом анализа на биочипе, соответствовали результатам, полученным классическими методами ДНК-диагностики на той же выборке образцов ДНК.

Разработанный нами способ ДНК-диагностики в будущем может стать альтернативным методом выявления носительства этих редких в мире, но часто встречающихся у якутов наследственных болезней, имеющих преимущество перед классическими методами



**Рис. 2.** Изображение продуктов ПЦР1 в 2% агарозном геле. Дорожка 1 – *Cul7* (0,8 пмоль) 203 п.н.; дорожка 1.1 – *Cul7* (2 пмоль) 203 п.н.; дорожка 2 – *NBAS* (0,8 пмоль) 185 п.н.; дорожка 2.1 – *NBAS* (2 пмоль) 185 п.н.; дорожка 3 – *DIA1* (0,8 пмоль) 220 п.н.; дорожка 3.1 – *DIA1* (2 пмоль) -220 п.н.; дорожка 4 – *GJB2* (0,8 пмоль) 284 п.н.; дорожка 4.1 – *GJB2* (2 пмоль) 284 п.н.; дорожка 4.3 – *GJB2* (4 пмоль) 284 п.н.; дорожка 5 – *FAH* (0,8 пмоль) 125 п.н.; дорожка 5.1 – *FAH* (2 пмоль) 125 п.н.; дорожка 5.2 – *FAH* (4 пмоль) -125 п.н.



**Рис. 3.** Изображения результатов сканирования биочипов на флуоресцентном сканере. Гомозиготы по мутациям 4582 insT в гене *CUL7* (а), 5741G/A в гене *NBAS* (б), P269L в гене *DIA1* (в), 1090G>C в гене *FAH* (г), IVS1+1G> A в гене *GJB2* (д). Гетерозиготы по мутациям 4582 insT в гене *CUL7* (е), 5741G/A в гене *NBAS* (ж), P269L в гене *DIA1* (з), 1090G> C в гене *FAH* (и), IVS1+1G> A в гене *GJB2* (к).

в скорости и затратах ресурсов. Тест-система послужит платформой для решения широкого круга практических диагностических задач.

**Благодарности.** Выражаем благодарность нашему индустриальному партнеру ООО «Вега» группы Алкор Био за помощь в осуществлении данной работы.

### Список литературы

1. Максимова Н.Р., Сухомьясова А.Л., Ноговицына А.Н. и др. Этнотипическая наследственная патология в РС(Я). *Якутский медицинский журнал*. 2009; (2): 15-19.
2. Пузырев В.П., Максимова Н.Р. Наследственные болезни у якутов. *Генетика*. (2008); (44): 1308–1314.
3. Kondo H., Maksimova N., Otomo T. et al. Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. *Human Molecular Genetics*. 2017; (26):173-183. doi: 10.1093/hmg/ddw377
4. Максимова Н.Р., Сухомьясова А.Л., Гуринова Е.Е. и др. Идентификация новой мутации в гене CUL7 при синдроме 3М- в якутской популяции. *Медицинская генетика*. 2007; (6): 34-38.
5. Maksimova N., Hara K., Miyashia A., et al., Molecular and histopathological features of short stature syndrome with novel CUL7 mutation in Yakuts: new population isolate in Asia. *Journal of Medical Genetics*. 2007; (44): 772-8.
6. Максимова Н.Р., Ноговицына А.Н., Куртанов Х.А. и др. Популяционная частота и возраст мутации G5741 → А в гене NBAS, являющейся причиной SOPH-синдрома в республике Саха (Якутия). *Генетика*. 2016; (52):1194-1201
7. Maksimova N., Hara K., Nikolaeva I. et al., Neuroblastoma amplified sequence gene is associated with a novel short stature syndrome characterised by optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly. *Journal of Medical Genetics*. 2010; (47): 538-548. Doi: 10.1136/jmg.2007.051979
8. Галеева Н.М., Назаренко Л.П., Назаренко С.А. Молекулярно-генетическая причина наследственной метгемоглобинемии первого типа в Якутии. *Медицинская генетика*. 2006; (5):15-20.
9. Галеева Н.М., Воеводова М.И., Спиридонова М.Г. и др. Популяционная частота и возраст мутации с.806с>t в гене CYP5B3, являющейся причиной наследственной метгемоглобинемии первого типа в Якутии. *Генетика*. 2013; (49): 23-30.
10. Maksimova N.R., Gurinova E.E., Sukhomyasova A.L. et al., A novel homozygous mutation causing hereditary tyrosinemia type I in Yakut patient in Russia: case report. *Wiadomości lekarskie*. 2016; (69): 295-8.
11. Барашков Н.А., Григорьева Л.В., Жемилева Л.У. Реконструкция гаплотипа основателя с мутацией Q.-3179 (IVS1+1G>A) в гене GJB2, приводящей к аутосомно-рецессивной глухоте типа 1А, в популяции якутов. *Медицинская генетика*. 2010; (11): 11-21.
12. Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in GJB2 gene as a result of founder effect. *Journal of Human Genetics*. 2011; (56): 631- 639. Doi: 10.1038/jhg.2011.72
13. Wilson R., De Bie I., Armour C. M. et al. Joint SOGC-CCMG Opinion for Reproductive Genetic Carrier Screening: An Update for All Canadian Providers of Maternity and Reproductive Healthcare in the Era of Direct-to-Consumer Testing. // *J Obstet Gynaecol Can*. 2016 Aug;38(8):742-762.e3. doi: 10.1016/j.jogc.2016.06.008.
14. Langlois S., Wilson R.D., Genetics Committee et al. Carrier screening for genetic disorders in individuals of Ashkenazi Jewish descent. *J Obstet Gynaecol Can*. 2006; (4): 324-332.

15. Максимова Н.Р., Николаева И.А., Коротков М.Н. и др. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2008; (108): 52-60
16. Heller M.J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annual review of biomedical engineering*. 2002; (4): 129-53.
17. Peeters J.K., Van der Spek P.J. Growing applications and advancements in microarray technology and analysis tools. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2005; (43): 149-66
18. Schrijver I., Oitmaa E., Metspalu A., Gardener P. Genotyping microarray for the detection of more than 200 CFTR mutations in ethnically diverse populations. *Journal of molecular diagnostics*. 2005; (7): 375-385. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60567-3
19. Schrijver I., Kulm M., Gardner P.I., Pergament E.P., Fiddler M.B. Comprehensive arrayed primer extension array for the detection of 59 sequence variants in 15 conditions prevalent among the (Ashkenazi) Jewish population. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2007;(9): 229-236 doi: 10.2353/jmoldx.2007.060100
20. Грядунов Д.А., Зименков Д.В., Михайлович В.М. и др. Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике. *Медицинский алфавит. Лаборатория*. 2009; (3).
21. Павлов А.Е., Апалько С.В., Воробьев Е.В. Молекулярно-генетическая диагностика муковисцидоза в формате микрочипа. *Лаборатория*. 2012; (4): 16-19.
22. Воробьев Е.В. Способ идентификации вызывающих муковисцидоз мутаций в гене CFTR человека, набор праймеров, биочип, набор мишеней и тест-система, используемые в способе. Федеральная служба по интеллектуальной собственности. 2014; RU229717

### References

1. Maksimova N.R., Sukhomyasova A.L., Nogovitsyna A.N. Entospecificheskaya nasledstvennaya patologiya v RS(Y) [Ethnospecific hereditary pathology in Republic of Sakha (Yakutia)]. *Yakutskii medicinskii jurnal [Yakutian medical journal]* 2009; (2): 15-19. (In Russ.)
2. Puzyirev V.P., Maksimova N.R. Nasledstvennie bolezni u yakutov [Hereditary diseases among Yakuts] *Genetika [Genetics]* 2008; (44): 1308–1314. (In Russ.)
3. Kondo H., Maksimova N., Otomo T. et al. Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. *Human Molecular Genetics*. 2017; (26):173-183. doi: 10.1093/hmg/ddw377
4. Maksimova N.R., Sukhomyasova A.L., Gurinova E.E. Identifikatsiya novoi mutatsii v gene CUL7 pri sindrome 3M v yakutskoi populyatsii. [Identification of new mutation in CUL7 gene at 3M-syndrome] *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2007; (6): 34-38. (In Russ.)
5. Maksimova N., Hara K., Miyashia A. et al., Molecular and histopathological features of short stature syndrome with novel CUL7 mutation in Yakuts: new population isolate in Asia. *Journal of Medical Genetics*. 2007; (44): 772-8.
6. Maksimova N.R., Nogovitsina A.N., Kurtanov H.A. Populyatsionnaya chastota i vozrast mutatsii G5741 → A v gene NBAS yavlyayusheysya prichinoi SOPH-sindroma v respublike `Sakha (Yakutia) [Population frequency and age of mutation G5741 → A in NBAS gene that is cause of SOPH-syndrome in republic of Sakha (Yakutia)] *Genetika [Genetics]* 2016; (52):1194-1201 (In Russ.)
7. Maksimova N, Hara K., Nikolaeva I. et al. Neuroblastoma amplified sequence gene is associated with a novel short stature syndrome characterised by optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly. *Jour-*

- nal of Medical Genetics*. 2010; (47): 538-548. Doi: 10.1136/jmg.2007.051979
8. Galeeva N.M., Nazarenko L.P., Nazarenko S.A. Molekulyarno-geneticheskaya prichina nasledstvennoi metgemoglobinemii pervogo tipa v Yakutii [Genetic cause of Methemoglobinemia type 1 in Yakutia] *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2006; (5):15-20. (In Russ.)
  9. Galeeva N.M., Voevodova M.I., Spiridonova M.G. Populyatsionnaya chastota i vozrast mutatsii c.806c>t v gene CYB5R3 [Population frequency and age of mutation c.806c>t in CYB5R3 gene. *Genetika [Genetics]* 2013; (49): 23-30. (In Russ.)
  10. Maksimova N.R., Gurinova E.E., Sukhomyasova A.L. et al., A novel homozygous mutation causing hereditary tyrosinemia type I in Yakut patient in Russia: case report. *Wiadomości lekarskie*. 2016; (69): 295-8.
  11. Barashkov N.A., Grigorieva L.V., Djemileva L.U. Rekonstruktsia gaplotipa osnovatelya s mutatsiei Q.-3179 (IVS1+1G>A) v gene GJB2 privodyashei k autosomno-recessivnoi glukhote tipa 1A v populyatsii yakutov [Reconstruction of founder haplotype with mutation Q.-3179 (IVS1+1G>A) in GJB2 gene] *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2010; (11): 11-21. (In Russ.)
  12. Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in GJB2 gene as a result of founder effect. *Journal of Human Genetics*. 2011; (56): 631- 639. Doi: 10.1038/jhg.2011.72
  13. Wilson R., De Bie I., Armour C. M. et al. Joint SOGC-CCMG Opinion for Reproductive Genetic Carrier Screening: An Update for All Canadian Providers of Maternity and Reproductive Healthcare in the Era of Direct-to-Consumer Testing.// *J Obstet Gynaecol Can*. 2016 Aug;38(8):742-762.e3. doi: 10.1016/j.jogc.2016.06.008.
  14. Langlois S., Wilson R.D., Genetics Committee et al. Carrier screening for genetic disorders in individuals of Ashkenazi Jewish descent. *J Obstet Gynaecol Can*. 2006; (4): 324-332.
  15. Maksimova N.R., Nikolaeva I.A., Korotkov M.N. et al., The clinical-genealogical and molecular-genetic characteristics of oculopharyngeal muscular dystrophy in the Republic of Sakha (Yakutia). *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2008; (108): 52-60. (In Russ.)
  16. Heller M.J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annual review of biomedical engineering*. 2002; (4): 129-53.
  17. Peeters J.K., Van der Spek P.J. Growing applications and advancements in microarray technology and analysis tools. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2005; (43): 149-66
  18. Schrijver I., Oitmaa E., Metspalu A., Gardener P. Genotyping microarray for the detection of more than 200 CFTR mutations in ethnically diverse populations. *Journal of molecular diagnostics*. 2005; (7): 375-385. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60567-3
  19. Schrijver I., Kulm M., Gardner P.I., Pergament E.P., Fiddler M.B. Comprehensive arrayed primer extension array for the detection of 59 sequence variants in 15 conditions prevalent among the (Ashkenazi) Jewish population. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2007;(9): 229-236 doi: 10.2353/jmoldx.2007.060100
  20. Gryadunov D.A., Zimenkov D.V., Mikhailovich V.M. Tekhnologia gidrogelevykh biochipov i ieiie primenenie v meditsinskoi laboratornoi diagnostike. [Hydrogel biochip technology and its application in medical diagnostics] *Meditsinskii alfavit. Laboratoria [Medical alphabet. Laboratory]* 2009; (3). (In Russ.)
  21. Pavlov A.E., Apalko S.V., Vorobyev E.V. Molekulyarno-geneticheskaya diagnostika mukovistidoza v formate mikrochupa [Molecular genetic diagnostics of Cystic fibrosis using microarray] *Laboratory [Laboratory]* 2012; (4): 16-19. (In Russ.)
  22. Vorobyev E.V. Sposob indentifikatsii vyzyvayushikh mukovistidoz mutatsii v gene CFTR cheloveka, nabor praimerov, biochip, nabor mishenei i test-sistema, ispolzuemee v sposobe [Воробьев Е.В. Способ идентификации вызывающих муковисцидоз мутаций в гене CFTR человека, набор праймеров, биочип, набор мишеней и тест-система, используемые в способе. *Федеральная служба по интеллектуальной собственности*. 2014; RU229717 (In Russ.)