

# ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫСОКОИНФОРМАТИВНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧИСЛОВЫХ АНОМАЛИЙ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»»

Числовые аномалии хромосом человека (анеуплоидии) являются самой частой причиной врожденной патологии человека. Частота трисомии хромосомы 21 (синдром Дауна) составляет в Беларуси 1:780. Одним из эффективных подходов диагностики анеуплоидий является метод количественной флуоресцентной ПЦР. Отобраны и протестированы наиболее информативные ДНК-маркеры хромосом 13, 18, 21 и X.

Разработан метод ДНК-диагностики наиболее частых анеуплоидий с использованием мультиплексной ПЦР и автоматического капиллярного электрофореза на основе одновременного тестирования 15 микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y в ходе одного анализа. Результат ДНК-диагностики числовых аномалий хромосом при применении технологии флуоресцентной количественной ПЦР может быть получен менее чем через 6 часов после выполнения биопсии или амниоцентеза.

**Ключевые слова:** анеуплоидия, числовые аномалии хромосом человека, флуоресцентная количественная ПЦР, пренатальная диагностика.

**T. V. Osadchuk, K. A. Mosse**

## THE RESEARCH OF HIGHLY INFORMATIVE DNA-MARKERS FOR DIAGNOSTICS OF HUMAN CHROMOSOMES NUMERICAL ABNORMALITIES

Numerical abnormalities of human chromosomes (aneuploidies) are the most frequent cause of congenital human pathology. The frequency of chromosome 21 trisomy (Down syndrome) constitutes 1:780 in Belarus. One of the most effective strategies for molecular diagnostics of aneuploidies is based on quantitative PCR analysis. We selected and tested the most informative DNA-markers of chromosomes 13, 18, 21 and X.

On the basis of current molecular genetic technologies there has been developed a method of DNA diagnostics of the most frequent aneuploidies using multiplex PCR and automated capillary electrophoresis based on the simultaneous testing of 15 microsatellite markers of chromosomes 13, 18, 21, X, Y in a single analysis. Results of DNA diagnostics of human chromosomes numerical abnormalities using fluorescent quantitative PCR technology can be obtained in less than 6 hours.

**Key words:** aneuploidy, numerical abnormalities of human chromosomes, fluorescent quantitative PCR, prenatal diagnosis.

Числовые аномалии хромосом человека (анеуплоидии) являются самой частой причиной врожденной патологии человека. Частота трисомии хромосомы 21 (синдром Дауна) составляет в Беларуси 1:780 [3]. Кро-

Таблица 1 – Характеристика полиморфных микросателлитных маркеров хромосом 21, 13, 18, X в популяции Беларуси.

Хромосома	Маркер	Размер аллелей	Число аллелей	Гетерозиготность	Тип маркера	Флуоресцентная метка
21	D21S11	235 – 270	13	86%	Тетрануклеотидный	FAM
	D21S1411	291 – 339	15	86%	Тетрануклеотидный	NED
	D21S1435	171 – 195	6	80%	Тетрануклеотидный	FAM
13	D13S634	391 – 419	11	90%	Тетрануклеотидный	FAM
	D13S252	278 – 306	9	72%	Тетрануклеотидный	PET
	D13S305	435 – 459	8	80%	Тетрануклеотидный	VIC
	D13S325	202 – 224	11	86%	Тетрануклеотидный	VIC
18	D18S391	150 – 166	5	62%	Тетрануклеотидный	VIC
	D18S390	272 – 300	10	72%	Тетрануклеотидный	NED
	D18S386	338 – 390	19	96%	Тетрануклеотидный	VIC
	D18S535	464 – 488	7	76%	Тетрануклеотидный	FAM
X	DXS1187	134 – 155	7	78%	Тетрануклеотидный	NED
	DXS981	236 – 258	10	74%	Тетрануклеотидный	NED

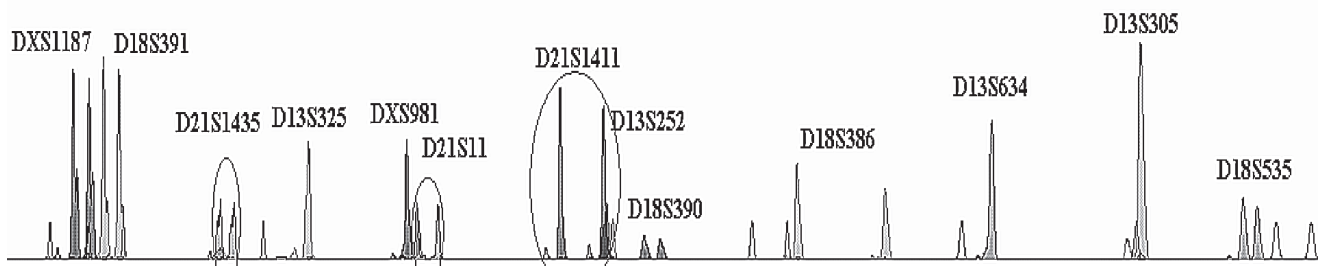


Рисунок 1. Микросателлитные маркеры хромосомы 21 – D21S1435, D21S11, D21S1411.

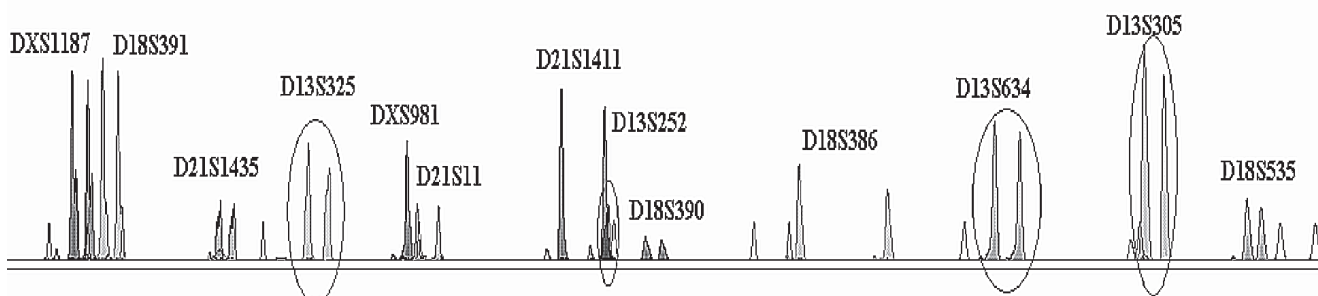


Рисунок 2. Микросателлитные маркеры хромосомы 13 – D13S325, D13S252, D13S634, D13S305.

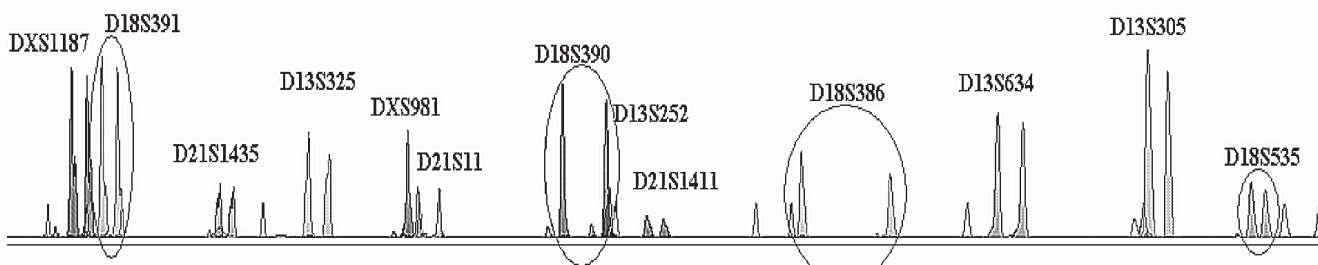


Рисунок 3. Микросателлитные маркеры хромосомы 18 – D18S391, D18S390, D18S386, D18S535.

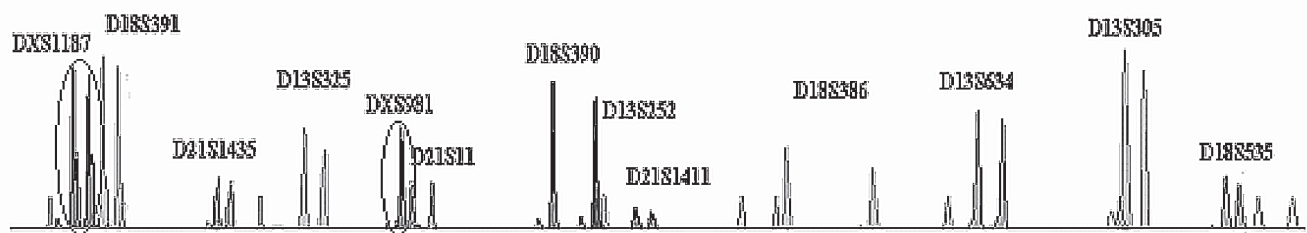


Рисунок 4. Микросателлитные маркеры хромосомы X – DXS1187, DXS981.

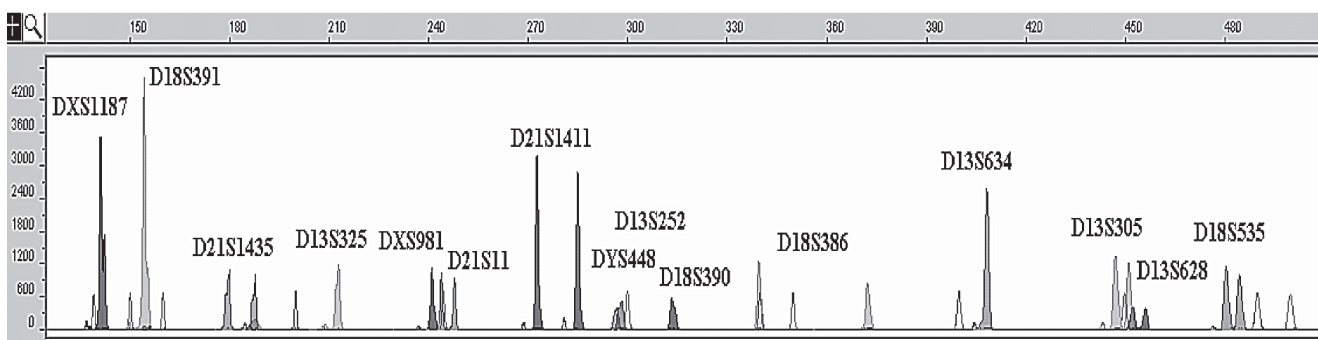


Рисунок 5. Результаты ДНК-анализа 15-ти микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y.

ме того, в большом проценте случаев наличие анеуплоидии у плода приводит к невынашиванию беременности и самопроизвольному аборту. Диагноз хромосомной патологии ставится после выполнения цитогенетического исследования (кариотипирования). В зависимости от срока беременности проводят цитогенетические исследования клеток ворсин хориона, плаценты, амниотической жидкости или пуповинной крови плода. Метод анализа дифференциально окрашенных хромосом до сих пор остается «золотым стандартом» диагностики. Основным достоинством метода является то, что он позволяет одновременно анализировать все хромосомы кариотипа и определять хромосомные перестройки размером не менее 5-10 млн. пар нуклеотидов. Однако кариотипирование плода на любом сроке беременности представляет собой длительный (14-21 день), трудоемкий процесс, не позволяющий быстро сделать заключение о наличии хромосомной патологии. В ряде случаев технические проблемы, возникающие при кариотипировании, такие как отсутствие роста культуры при исследовании амниоцитов или ворсин хориона делают проведение анализа невозможным. В этих случаях показана повторная инвазивная диагностическая процедура, которая увеличивает риск развития акушерских осложнений [4].

Введение в клиническую лабораторную практику молекулярно-генетических методов позволило дополнить стандартный цитогенетический анализ новыми возможностями и избежать некоторых ограничений. Наибольшее распространение получили методы интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР). Важно отметить, что эти методы не заменяют традиционного кариотипирования. В пренатальной диагностике они применяются в качестве дополнительных при необходимости быстрого исследования состояния плода с высоким риском хромосомной патологии, в том числе и с хромосомным мозаицизмом, кариотип которого будет в дальнейшем детально проанализирован [1, 2, 5].

Использование метода КФ-ПЦР для диагностики анеуплоидий впервые было предложено в 90-х годах XX века [6, 7]. Для выявления анеуплоидий исследуют области хромосом, содержащие полиморфные tandemные повторы (микросателлитные маркеры). С целью увеличения информативности, как правило, используют 3-4 маркера на каждую хромосому [8]. Данный метод основан на мультиплексной ПЦР с использованием флуоресцентно-меченых праймеров.

Целью работы являлось исследование ДНК-маркеров и разработка на основе их анализа эффективной технологии диагностики наиболее частых числовых аномалий хромосом человека.

#### Материал и методы

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из клеток амниотической жидкости, ворсин хориона, тканей плода.

Первоначальный отбор микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, и Y основывался на имеющихся в литературе данных о характеристиках и информативности маркеров. Учитывались размер и количество аллелей каждого маркера, а также степень их гетерозиготности.

Выполнение методики после подготовки биологического материала состоит из трех основных этапов: выделения ДНК, амплификации участков хромосом, содержащих микросателлитные маркеры с помощью ПЦР и анализа полученной смеси фрагментов методом автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием.

Оригинальные научные публикации □

Оработка условий получения фрагментов ДНК, включающих последовательности микросателлитных маркеров, проводилась путем подбора состава амплификационной смеси и оптимальных температурно-временных условий проведения ПЦР. Амплификацию проводили с использованием праймеров, фланкирующих последовательности, содержащие маркеры. Для анализа образцов ДНК в автоматическом анализаторе в ПЦР использовались меченые варианты прямых праймеров, имеющие одну из четырех флуоресцентных меток.

Реакционная смесь с конечным объемом 25 мкл содержала 1xПЦР буфер, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP, и 1.5 ЕД Taq полимеразы. Концентрация праймеров варьировала от 1.5 пМ до 10 пМ на 1 пробу. После денатурации образцов при 94°C в течение 10 минут следовали 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 94°C; 60 с отжига при 57°C и 2 мин синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживали в течение 5 мин при 72°C.

Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310. Из каждой реакции 1 мкл амплификата смешивали с 0.6 мкл маркера молекулярного веса LIZ 500 (Applied Biosystems) и 8 мкл деионизированного формамида. Смесь денатурировали 2 мин при 95°C. Электрофорез проводили при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр 5 сек, время разделения 28 мин, напряжение 15 кВ, длина детектора 47 см. Для разделения использовали 4% раствор полимера POP – 4™ (Applied Biosystems). Обработку данных и определение аллелей выполняли с помощью пакета компьютерных программ GENESCAN.

#### Результаты и обсуждение

Принцип метода количественного определения аллелей внутрилокусных микросателлитных маркеров, различающихся по числу повторов, заключается в том, что при анализе маркера, имеющего высокую степень полиморфизма, его аллели с большой вероятностью будут отличаться в каждом из исследуемых локусов генома пациента. Такой анализ позволяет увидеть столько аллелей маркера, сколько локусов или сцепленных с ним генов присутствует в геноме. В норме это число составляет два для локусов аутосомных хромосом и хромосомы X у женщин, и один для половых хромосом у мужчин. У пациентов с трисомиями маркеры будут иметь три аллеля за счет лишней хромосомы, а у пациентов с моносомиями маркеры будут иметь один аллель за счет отсутствия одной из хромосом. Вероятность того, что все три аллеля маркера будут различаться по размеру, зависит от типа маркера и степени его полиморфизма, который определяется уровнем гетерозиготности в популяции. Интерпретация результатов проводится с учетом количества пиков и их относительной высоты на электрофореграмме.

В норме при использовании одного микросателлитного маркера на электрофореграмме можно увидеть два различных варианта: два пика с отношением высот между 0.8 и 1.4 (здоровая гетерозигота) или один пик (гомозигота). Обнаружение одного пика не позволяет точно определить, сколько аллелей, а соответственно, и хромосом, имеет данный человек. При обнаружении трисомии с использованием одного маркера на электрофореграмме могут быть следующие варианты:

## ■ Оригинальные научные публикации

1. присутствие трех пиков почти равной высоты;
2. присутствие двух пиков с соотношением между ними более 1.8 в том случае, если меньший по длине пик представлен двумя аллелями одного размера (дозовый эффект);
3. присутствие двух пиков с соотношением между ними 0.65 в том случае, если больший по длине пик представлен двумя аллелями одного размера (дозовый эффект);
4. присутствие одного пика (такой анализ является неинформативным).

Эффективность исследования, а также сокращение времени и затрат на молекулярно-генетический анализ можно получить путем одновременного определения нескольких маркеров для каждой хромосомы.

Для практического тестирования отобрано 14 микросателлитных маркеров:

3 микросателлитных маркера хромосомы 21-D21S11, D21S1411, D21S1435;

4 микросателлитных маркера хромосомы 13-D13S634, D13S252, D13S305, D13S325;

4 микросателлитных маркера хромосомы 18-D18S391, D18S390, D18S386, D18S535;

3 микросателлитных маркера хромосомы X-DXS981, DXS1187, AMEL.

Для определения уровня гетерозиготности и информативности отобранных микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X анализ исследуемых фрагментов ДНК выполнен в 50 образцах (100 хромосом) контрольной выборки.

Гетерозиготность маркеров в популяции Беларуси рассчитывали по формуле  $H=1 - q^2$ , исходя из закона Харди-Вайнберга для мультиаллельных локусных систем.

Все отобранные маркеры хромосомы 21 являются тетра-нуклеотидными и расположены на критичной для синдрома Дауна области 21q22.1 – 21q22.3.

Микросателлитный маркер D21S11 расположен в сегменте q22.1 хромосомы 21, для обеспечения флуоресценции имеет метку FAM. В ходе проведения исследования данного маркера в 50 образцах контрольной группы идентифицированы 13 аллелей, имевшие размер от 235 до 270 п.н. Гетерозиготность маркера D21S11 составила 86%. Из 50 человек контрольной группы у 43 было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер D21S1411 расположен в сегменте q22.3 хромосомы 21, имеет метку NED. При исследовании полиморфизма D21S1411 в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 15 различных аллелей, имевших размер от 291 до 339 п.н. Гетерозиготность маркера D21S1411 составила 86%. У 43 из 50 человек контрольной группы было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер D21S1435 расположен в сегменте q21.3 хромосомы 21, имеет метку FAM. При исследовании данного маркера в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 6 различных аллелей, имевших размер от 171 до 195 п.н. Гетерозиготность маркера D21S1435 составила 80%. У 40 из 50 человек контрольной группы было определено два различных аллеля.

Результаты ДНК-анализа 3 микросателлитных маркеров хромосом 21 представлены на рисунке 1.

Отобранные маркеры хромосомы 13 располагаются на q-плече и являются тетра-нуклеотидными.

Микросателлитный маркер D13S634 расположен в сегменте q21.33 хромосомы 13, имеет метку FAM. В ходе

проведения исследования данного маркера в 50 образцах контрольной группы идентифицировано 11 аллелей, имевшие размер от 391 до 419 п.н. Гетерозиготность маркера D13S634 составила 90%. У 45 из 50 человек контрольной группы было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер D13S252 расположен в сегменте q12.2 хромосомы 13, имеет метку PET. При исследовании полиморфизма D13S252 в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 9 различных аллелей, имевших размер от 278 до 306 п.н. Гетерозиготность маркера D13S252 составила 72%. У 36 из 50 человек контрольной группы было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер D13S305 расположен в сегменте q13.3 хромосомы 13, имеет метку VIC. При исследовании данного маркера в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 8 различных аллелей, имевших размер от 435 до 459 п.н. Гетерозиготность маркера D13S305 составила 80%. Из 50 человек контрольной группы у 40 было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер D13S325 расположен в сегменте q14.11 хромосомы 13, имеет метку VIC. При исследовании данного маркера в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 11 различных аллелей, имевших размер от 202 до 224 п.н. Гетерозиготность маркера D13S325 составила 86%. У 43 из 50 человек контрольной группы было определено два различных аллеля.

Результаты ДНК-анализа 4 микросателлитных маркеров хромосомы 13 представлены на рисунке 2.

Отобранные для исследования маркеры хромосомы 18 являются тетра-нуклеотидными и располагаются по всей длине хромосомы.

Микросателлитный маркер D18S391 расположен в сегменте p11.31 хромосомы 18, имеет метку VIC. При исследовании данного маркера в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 5 различных аллелей, имевших размер от 150 до 166 п.н. Гетерозиготность маркера D18S391 составила 62%. У 31 из 50 человек контрольной группы было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер D18S390 расположен в сегменте q22.3 хромосомы 18, имеет метку NED. При исследовании данного маркера в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 10 различных аллелей, имевших размер от 272 до 300 п.н. Гетерозиготность маркера D18S390 составила 72%. У 36 из 50 человек контрольной группы было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер D18S386 расположен в сегменте q22.1 хромосомы 18, имеет метку VIC. При исследовании полиморфизма D18S386 в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 19 различных аллелей, имевших размер от 338 до 390 п.н. Гетерозиготность маркера D18S386 составила 96%. У 48 из 50 человек контрольной группы было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер D18S535 расположен в сегменте q12.3 хромосомы 18, для обеспечения флуоресценции имеет метку FAM. В ходе проведения исследования данного маркера в 50 образцах контрольной группы идентифицировано 7 аллелей, имевшие размер от 464 до 488 п.н. Гетерозиготность маркера D18S535 составила 76%. Из 50 человек контрольной группы у 38 было оп-

## Оригинальные научные публикации □

ределено два различных аллеля.

Результаты ДНК-анализа 4 микросателлитных маркеров хромосомы 18 представлены на рисунке 3.

Отобранные маркеры хромосомы X являются тетра-нуклеотидными и располагаются по всей длине хромосомы.

Микросателлитный маркер AMEL расположен в сегменте p22.22 хромосомы X и в сегменте p11.2 хромосомы Y, имеет два аллеля: 104 п.н. на хромосоме X и 109 п.н. на хромосоме Y.

Микросателлитный маркер DXS1187 расположен в сегменте q26.2 хромосомы X, имеет метку NED. В ходе проведения исследования данного маркера в 50 образцах контрольной группы идентифицировано 7 аллелей, имевшие размер от 134 до 155 п.н. Гетерозиготность маркера DXS1187 составила 78%. У 21 из 27 женщин контрольной группы было определено два различных аллеля.

Микросателлитный маркер DXS981 расположен в сегменте q13.1 хромосомы X, имеет метку NED. При исследовании полиморфизма DXS981 в 50 проанализированных ДНК – образцах идентифицировано 10 различных аллелей, имевших размер от 236 до 258 п.н. Гетерозиготность маркера D13S252 составила 74%. У 20 из 27 женщин контрольной группы было определено два различных аллеля.

Результаты ДНК-анализа микросателлитных маркеров хромосомы X представлены на рисунке 4.

Характеристики маркеров, установленные в результате исследования, представлены в таблице 1.

Для определения пола, а также для установления синдрома Кляйнфельтера в работу был включен микросателлитный маркер DYS448 хромосомы Y.

Полученные данные свидетельствуют, что все маркеры обладают высоким уровнем гетерозиготности и могут быть эффективно использованы для определения анеуплоидий хромосом 13, 18, 21 и X методом количественного определения аллелей внутрилокусных микросателлитных маркеров.

На основании проведенного исследования разработан протокол ДНК-диагностики наиболее частых хромосомных анеуплоидий (синдромов Дауна, Эдвардса, Патау, Тернера, Кляйнфельтера) с использованием мультиплексной ПЦР и автоматического капиллярного электрофореза. Выполнение методики включает в себя одновременное тестирование 15 микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y в ходе одного анализа.

Для выполнения мультиплексной ПЦР подобраны оптимальные концентрации праймеров для всех микросателлитных маркеров. С целью увеличения информатив-

ности в анализ включено от 3 до 4 маркеров на каждую из тестируемых хромосом, как показано на рисунке 5.

Исследованные микросателлитные маркеры хромосом 13, 18, 21 и X обладают высоким уровнем гетерозиготности и могут быть эффективно использованы для определения анеуплоидий.

Таким образом, разработан метод ДНК-диагностики наиболее частых хромосомных анеуплоидий с использованием мультиплексной ПЦР и автоматического капиллярного электрофореза на основе одновременного тестирования 15 микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X и Y в ходе одного анализа. Метод отличается высокой точностью даже при небольшом количестве материала. Преимущество его состоит в том, что это более дешевый метод, позволяющий одновременно оценить большое количество образцов и сопоставим со стандартным кариотипированием. В процессе исследования показано, что результат ДНК-диагностики числовых аномалий хромосом человека при применении технологии флуоресцентной количественной ПЦР может быть получен менее чем через 6 часов после выполнения биопсии или амниоцентеза, что при пренатальной диагностике имеет решающее значение.

### Литература

1. Антоненко, В. Г. Рекомендации по обеспечению качества и надежности цитогенетических исследований. Европейские стандарты для цитогенетических исследований институциональных и приобретенных хромосомных аномалий / В. Г. Антоненко, И. Г. Лиль // Мед. генетика. – 2008. – № 3. – С. 13 – 33.
2. Баранов, В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В. С. Баранов, Т. В. Кузнецова. Ст-Петербург, издательство Н – Л 2007. – С. 370 – 371.
3. Зацепин, И. О. Аутосомные трисомии у потомков облученных родителей на примере синдрома Дауна: автореф. дисс. ...канд. биол. наук. / И. О. Зацепин. Мн., 2004. – 21 с.
4. Никитина, В. А. Молекулярно-генетические методы пренатальной диагностики анеуплоидий / В. А. Никитина, Е. Ю. Воскобоева, Е. А. Калашникова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2009. – № 5. – С. 35 – 38.
5. Dudarewicz, L. [et al.] Molecular methods for rapid detection of aneuploidy / L. Dudarewicz [et al.] // J. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 46, № 2. – P. 207 – 215.
6. Mansfield, E. S. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms / E. S. Mansfield // Hum. Mol. Genet. – 1993. – Vol. 2. – P. 43 – 50.
7. Pertl, B. [et al.] Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome / B. Pertl [et al.] // Lancet. – 1994. – Vol. 343. – P. 1197 – 1198.
8. Schmidt, W. [et al.] Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk / W. Schmidt [et al.] // Mol. Hum. Reprod. – 2000. – Vol. 6, № 9. – P. 855 – 860.

Поступила 28.12.2011 г.