

**POLİMERAZA-ZƏNCİRVARİ REAKSİYASINA ƏSASLANAN  
DİAQNOSTİK METODLAR VƏ TƏTBİQ SAHƏLƏRİ****K.Ə.ƏLİYEV, Z.F.ƏFƏNDİBƏYLİ, E.M.RƏSULOV, E.E.RƏSULOV****Bakı Dövlət Universiteti, GEN LAB****kama\_fuadik@mail.ru**

*Polimeraza-zəncirvari reaksiyası metodunun prinsipləri və tətbiq sahələri şərh edilir. Azərbaycan Respublikasının Quba və Xaçmaz rayonlarının əhalisində yüksək temperaturlu allel-spesifik amplifikasiya metodu vasitəsilə beta-talassemiya mutasiyasının və qlükoza-6-fosfatdehidrogenaza fermentinin çatışmazlığının öyrənilməsinin eksperimental nəticələri verilir.*

Molekulyar biologiya və molekulyar genetika elmlərinin inkişafı bir sıra yeni diaqnostika üsullarının işlənilməsinə səbəb olmuşdur ki, bu da öz növbəsində molekulyar diaqnostikanın, molekulyar təbabətin sürətlə inkişafına səbəb olmuşdur. Kəşflərdən ən əhəmiyyətli hüceyrə bölünməsinə mövcud replikasiya prosesinin in vitro təkrarı olan “Polimeraza Zəncirvari Reaksiyasıdır” (PZR). PZR üsulunun kəşfinə görə yapon mənşəli amerika alimi Saiki 1988-ci ildə biologiya elmi sahəsində Nobel mükafatına layiq görülmüşdür. PZR metodu üçün çox az bioloji material (DNT və RNT) tələb olunur. Hətta bir hüceyrədən alınmış genetik material səviyyəsində belə genetik patologiyası məlum olan istənilən irsi xəstəliyin diaqnostikasını aparmaq mümkündür. Bioloji materialın – çift hüceyrələrinin (xorion hüceyrələri), amniotik məhlulun fibroblastlarının az miqdarı ilə PZR metodunun iştirakı ilə bir sıra irsi xəstəliklərin ana bətnində erkən prenatal diaqnostikası mümkün olmuşdur. Prenatal diaqnostikası mümkün olan irsi xəstəliklərdən;  $\alpha$ -talassemiyanı,  $\beta$ -talassemiyanı, ayparaşəkili anemiyani, Hemofiliya A və Hemofiliya B-ni, Qentington Xoreyasını, Düşən Sindromunu, Hemoxromatozu, qlükokoza-6-fosfatdehidrogenaza fermentinin (Q6FD) çatışmazlığını, Zandqoff xəstəliyini və s. göstərmək olar (4, 5, 10, 11, 12).

1988-1994-cü illər ərzində Azərbaycan Respublikasının ET Mamalıq və Ginekologiya İnstitutunun Tibbi-genetika laboratoriyasının əməkdaşları PZR-na əsaslanan molekulyar diaqnostikadan istifadə edərək Rusiya Elmlər Akademiyasının Molekulyar Genetika İnstitutunun “İnsan Genetikası”, Tibbi Elmlər Akademiyasının Tibbi-Genetika İnstitutunun “Prenatal Diaqnostika” laboratoriyaları və İtaliyanın Sardinia adasında yerləşən “Prenatal Diaqnostika” mərkəzi (Kalyari şəhəri) ilə birlikdə Respublikanın əhalisində  $\beta$ -talassemiyanın 23 müxtəlif mutasiyası aşkar edilərək identifikasiyasını aparmışdır (3,7,8).

1989-cu ildə SSRİ-də ilk dəfə olaraq  $\beta$ -talassemiyanın, 1990-cı ildə oraqvari hüceyrə anemiyasının ana bətnində prenatal diaqnostikası Azərbaycan Respublikasının ET Mamalıq və Ginekologiya İnstitutunun Tibbi-genetika laboratoriyasının və Rusiyanın Tibbi Genetika İnstitutunun Prenatal Diaqnostika laboratoriyasının əməkdaşları tərəfindən iki azərbaycanlı ailəsində aparılmışdır (1,2).

Tədqiqatlarımızda məqsədimiz PZR əsaslanan metodlar kompleksindən istifadə edərək Azərbaycan Respublikasının əhalisində təsadüf edən irsi qan xəstəliklərindən, beta-talassemiyanın və Q6FD molekulyar tiplərinin identifikasiyası olmuşdur.

### **Material və metodika**

Eksperimental material Quba və Xaçmaz rayonlarının əhalisinin genetik tədqiqatları zamanı toplanmışdır. Analiz üçün həcmi 3-5 ml olan venoz qandan istifadə edilmişdir. Talassemiyanın diaqnostikası izoelektrofokuslaşdırma, Q6FD fermentinin aktivliyi Beutler tərəfindən təklif edilmiş metodlar vasitəsilə aparılmışdır (6).

*Polimeraza-zəncirvari reaksiyası metodunun prinsipi* (9). Metodun əsasında nuklein turşularının (DNT və RNT) unikal xüsusiyyəti – özünün reproduksiyası durur. Bu xüsusiyyətdən istifadə edərək sınaq şüşəsində in vitro süni olaraq nuklein turşusunun spesifik fraqmentinin əlavə kopyyası alınır. PZR metodunu aparmazdan əvvəl kopyasının çıxarılması tələb olunan nuklein turşusunun birincili strukturu – nukleotid ardıcılığı müəyyən edilməlidir. Fraqmentin nukleotid ardıcılığı müəyyən edildikdən sonra hədəf nukleotid fraqmentinə komplementar olan iki sintetik DNT-zond və ya praymer sintez edilir. Praymer PZR-da ən əsas element olaraq spesifik reaksiyanın başlanmasına təkan verir. Beləliklə, PZR üçün test tədqiq edilən nuklein turşularından, praymerdən, dezoksiribonukleotidlərdən (dATF, dTTF, dQTF və dSTF), termoabil DNT-polimerazadan (*Termus aquaticus* adlı termofil bakteriyanın fermenti) ibarət olmalıdır. Nuklein turşusunun fraqmentinin sintezi məqsədilə reaksiya qarışığı olan PZR testi sınaq süsəsi ilə birlikdə təkrar olaraq DNT və ya RNT fraqmentinin denaturasiyası məqsədilə qızdırılaraq, praymer ilə nuklein turşularının hibridizasiyası üçün soyudulur. Bir dəfə qızdırılma (denaturasiya), bir dəfə soyudulma (otjiq) və bir dəfə reaksiyanın aparılması, bir mərhələ kimi qəbul edilərsə, PZR-i tam şəkildə aparmaq üçün 30-50 sikkədən istifadə edilir. Reaksiya tam bitdikdən sonra sintez olunmuş genetik materialın – DNT fraqmentinin miqdarı 200-250 min dəfə artaraq molekulyar diaqnostikanın aparılmasına kifayət edir. PZR proqramlaşdırılan avtomatik termostatda – termosikler (amplifikator) adlı cihazda aparılır. Amplifikator qısa zaman ərzində reaksiya məhlulunu metodika üzrə tələb olunan sayda qızdıraraq soyudur.

Birinci sikkədə – denaturasiya adlanan mərhələdə, nuklein turşusunun ikiləşmə prosesi gedir; bir cüt nuklein turşusundan ibarət olan nuklein turşusu iki zəncirə ayrılır. Ayrılmış hər bir nuklein turşusunun zənciri sintetik oliqonukleotid praymerlə birləşir. Bu mərhələ otjiq adlanır. Reaksiya mərhələsində fermentin iştirakı ilə praymerin yerləşdiyi yerdən başlayaraq tələb olunan DNT fraqmentinin sintezi gedir. Proqramlaşdırılmış üç temperatur rejiminin təkrar olunması reaksiyanın zəncirvari xarakter almasına və tələb olunan DNT fraqmentinin nüsxələrinin həndəsi silsilə üzrə artmasına gətirib çıxarır. Aparılan reaksiya təbii replikasiya prosesinə bənzəyir, lakin süni sintez edilmiş sintetik oliqonukleotid praymerlər tərəfindən konkret fraqmentin sintezi aparılır. Bir mərhələyə orta hesabla 3 dəqiqə tələb olunursa, təxminən iki saat ərzində tələb olunan DNT fraqmentinin bir milyard nüsxəsini əldə etmək müm-

kündür. İstifadə edilən praymerə uyğun nuklein ardıcılığı olmayan halda milyon digər nuklein ardıcılıqları olan halda belə PZR getmir. DNT-polimeraza fermenti seçicilik qabiliyyətinə malik olaraq lazımsız nukleotidləri qeyri-komplementar nukleotidləri istifadə etmir. PZR nəticəsində əldə edilmiş nukleotid fraqmenti – amplifikat elektroforez vasitəsilə aşkarlanır. PZR-na məruz qalmış DNT fraqmentinin nukleotid ardıcılığı “Sekam”, miqdarı “Real-Time” cihazlarında aparılır. PZR metodunun digər kliniki-laborator metodlarından üstünlüyü: 1. universallığında; 2. spesifikliyində; 3. həssaslığında; 4. nəticələrin tezliyində; 5. klinikaya qədər və retrospektiv nəticələrin əldə edilməsində; 6. miqdarca kiçik obyektlərin analizinin aparılmasında; 7. bir neçə infeksiyanın eyni zamanda aşkarlanmasında və 8. əldə edilmiş nəticələrin ekspertizasının mümkünliyündədir.

PZR-nın çatışmayan cəhəti ondan ibarətdir ki, analiz yüksək texnologiyanın məhsulu olan cihazlardan, yüksək təmizlik və spesifikliyə malik reaktivlərdən istifadə edərək, hazırlıqlı mütəxəssislərin iştirakı ilə aparılmalıdır.

PZR metodunun kliniki və praktiki əhəmiyyəti olaraq üç suala cavab verir: 1. anormal genin və patogen mikrobun olub-olmamasını müəyyənləşdirir; 2. müalicə etməli və ya etməməli suallarına əksər hallarda cavab verir və 3. aparılan terapiyanın keyfiyyətinə törədicinin və anormal genin olub-olmamasından asılı olaraq nəzarətin aparılması.

PZR-nın aparılmasına olan ümumi tələbat: 1-ci mərhələ - xəstənin şikayətlərinin, anamnezinin toplanması, kliniki və fiziki müayinəsi; 2-ci mərhələ - kliniki müayinədən irəli gələn rutin kliniki analizlərin; sidiyin, qanın, nəcisin və digər müayinələrin aparılması və 3-cü mərhələ - əvvəlki iki mərhələyə əsasən xüsusi təyinatlı analizlərin; seroloji, immunoloji və instrumental müayinələrin aparılması və 4-cü mərhələ - molekulyar genetik, əsasən də PZR-nın aparılması.

### **Nəticələr və onların müzakirəsi**

Həcmi 0,2 ml olan eppendorf sınaq şüşəsinə 5 mkl genom DNT-si, 20 mkl sintetik oliqonukleotid praymerlər, dezoksiribonukleotidlərdən (dATF, dTTF, dQTF və dSTF), və 0,2 mkl termostabil DNT-polimeraza fermenti əlavə edilir. DNT fraqmentinin sintezi məqsədlə reaksiya qarışığı bir dəfə qızdırılma-denaturasiya (92°S, 20 saniyə), bir dəfə soyudulma- otjiq (55°S, 30 saniyə) və bir dəfə reaksiyanın aparılması ilə bir mərhələ kimi qəbul edilərsə (72°S, 40 saniyə), PZR-nı tam şəkildə aparmaq üçün 30 sikldən istifadə edilmişdir. Əldə edilmiş DNT fraqmentinin miqdarı qarşımıza qoyulmuş molekulyar diaqnostikanın aparılmasına kifayət etmişdir.

$\beta$ -talassemiyanın üç mutasiyası aşkar edilmişdir: 1.  $\beta$ -Qlobin Geninin ( $\beta$ -QG) birinci ekzonunun 8-ci kodonunda iki adenin nukleotidinin delesiyası (kodon 8, -AA); 2.  $\beta$ -QG birinci kiçik intronunda 110-cu vəziyyətdə qvanin nukleotidinin adenin nukleotidi ilə əvəzi (IVS-1-110, G-A) və 3.  $\beta$ -QG ikinci böyük intronunda birinci vəziyyətdə olan qvanin nukleotidinin adenin nukleotidi ilə əvəzi (IVS-II-1, G-A). Hər üç mutasiya Respublikanın əhalisində aşkar edilmiş talassemiya mutasiyaları arasında üstünlük təşkil edərək aşkar edilmiş bütün mutasiyaların 65-70%-ni təşkil edir (3,4,7,8).

Ədəbiyyatın analizinə istinad edərək qeyd edilməlidir ki,  $\beta^0$ -IVS-2-1 (Q-A) və  $\beta^+$ -IVS-1-110 (Q-A) mutasiyaları  $\beta$ -qlobin polipeptidinin biosintezini prosessinq mərhələsini,  $\beta^0$ -kodon 8 (-AA) mikrodelesiyası stop kodon əmələ gətirərək transkripsiya

prosesini pozur (7).

İdentifikasiya edilmiş mutasiyalardan  $\beta^0$ - və  $\beta^+$ -fenotopinə malik olmuşdur.  $\beta^0$ -fenotipində,  $\beta^+$ -fenotipindən fərqli olaraq beta qlobin geninin ekspressiyası tamamilə pozulur. DNT analizində identifikasiya edilməmiş mutasiyalar izoelektrofokuslaşdırma yolu ilə alınmış nəticələri təsdiq etmişdir.

Q6FD fermentinin iki müxtəlif molekulyar tipləri aşkar edilmişdir. Mutasiyanın identifikasiyası fermentin “0” aktivliyi olan hemiziqotlarda aparılmışdır. Birinci genin tədqiqi zamanı genin daxilində iki müxtəlif mutasiya identifikasiya edilmişdir: 202-ci vəziyyətdə qüanin nukleotidinin adeninlə əvəzi və 376-cı vəziyyətdə adenin nukleotidinin qüaninlə əvəzi Q6FD A (-) tipinə xarakterdir. İkinci mutasiya zamanı genin 563-cü vəziyyətində sitozin nukleotidinin timinlə əvəzi aşkar edilmişdir. Bu mutasiya Q6FD B (-) tipinə xarakterdir. Tədqiqatlarımızda talassemiya və Q6FD fermentinin Quba və Xaçmaz rayonlarının əhalisində aşkar edilmiş mutasiyaları öncədən elmə məlum olaraq Aralıq Dənizi hövzəsində yerləşən dövlətlərin əhalisində aşkar edilmişdir.

Beləliklə, PZR-na əsaslanan metodlar kompleksindən istifadə edərək Quba və Xaçmaz rayonlarının əhalisində təsadüf olunan  $\beta$ -talassemiya və Q6FD fermentinin defisitində xəstəliyin molekulyar tipi identifikasiya edilmişdir.  $\beta$ -talassemiyanın üç, Q6FD fermentinin defisitində iki mutasiya aşkar edilmişdir.

### Nəticə

1.  $\beta$ -talassemiyanın üç mutasiyası aşkar edilmişdir: 1.  $\beta$ -QG birinci ekzonunun 8-ci kodonunda iki adenin nukleotidinin delesiya (kodon 8, -AA); 2.  $\beta$ -QG birinci kiçik intronunda 110-cu vəziyyətdə qüanin nukleotidinin adenin nukleotidi ilə əvəzi (IVS-1-110, G-A) və 3.  $\beta$ -QG ikinci böyük intronunda birinci vəziyyətdə olan qüanin nukleotidinin adenin nukleotidi ilə əvəzi (IVS-II-1, G-A).
2. Q6FD fermentinin iki müxtəlif molekulyar tipləri aşkar edilmişdir. 1. Birinci genin daxilində iki mutasiya identifikasiya edilmişdir: 202-ci vəziyyətdə qüanin nukleotidinin adeninlə əvəzi və 376-cı vəziyyətdə adenin nukleotidinin qüaninlə əvəzi Q6FD A (-) tipinə xarakterdir. İkinci mutasiyada genin 563-cü vəziyyətində sitozinin timinlə əvəzi aşkar edilmişdir. Bu mutasiya Q6FD B (-) tipinə xarakterdir.

### ƏDƏBİYYAT

1. Кулиев А.М., Мазурова О.Л., Бирюков В.Б., Матвеева Е.В., Расулов Э.М. и др. Пренатальная диагностика бета-талассемии. Акушерство и гинекология, 1991, №7, с. 16-18.
2. Кулиев А.М., Мазурова О.Л., Бирюков В.Б., Расулов Э.М. и др. Первый случай пренатальной диагностики серповидноклеточной анемии в СССР. Гематология и трансфузиология, 1990, №3, с. 8-9.
3. Расулов Э.М., Ифраимова З.Н., Широнова И.Л. Молекулярные формы талассемии у населения двух регионов Азербайджанской ССР. Азмеджурнал, 1990, №9, с. 28-31.
4. Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Caskey C.T. Multipleks PCR for the Diagnosis of Duchenne Muskular Dystrophy. A Guide to Methods and Applications. Edited by M.A.Innis, D.H.Gelfan, J.J. Sninsky and T.J.White. Academic press inc. New York. 2000, p. 272..
5. Crescent M. B-Cell Lymphoma: t (14;18) Chromosome Rearrangement. A Guide to Methods and Applications. Edited by M.A.Innis, D.H.Gelfan, J.J. Sninsky and T.J.White. Academic press inc. New York. 2000, p. 392.

6. Dacie S.J., Levis S.M. Practical Haematology. London, 1999. p.453.
7. Fyodorov A.P., Rasulov E.M., Nasyrova F., et al. Molecular analysis of  $\beta$ -thalassemia in two Soviet populations. 8<sup>th</sup> World Congress on Human Genetics, USA, Washington, 1991, p.78.
8. Rasulov E.M., Mamedov K. Yu., Haji-zade B. et al. Thalassemia mutant gene geographical distribution in Azerbaijan population. European Association of Gynaecologists and Obstetrians, 6<sup>th</sup> Meeting, Moscow, 1991, p. 101-2.
9. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985, 230, p. 1350-1354.
10. Rorbart H.A. PCR Amplification of Enteroviruses. A Guide to Methods and Applications. Edited by M.A.Innis, D.H.Gelfan, J.J. Sninsky and T.J.White. Academic press inc. New York, 2000, p. 372.
11. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Попов В.О. и др. Системы экспрессной иммунодетекции биологически активных соединений // Клини. лаб. диагн. 2002, в.8, с.25-32.
12. Pope CF, Capaldi K. Comparison of the analytical sensitivity of three commercial real time PCR assays for the detection of MRSA. Poster session presented at: Seventh International Conference of the Hospital Infection Society; Liverpool, UK, 2010, Oct. 10-13.

## **ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ, И ОБЛАСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

**К.А.АЛИЕВА, З.Ф.ЭФЕНДИБЕЙЛИ, Э.М.РАСУЛОВ, Э.Э.РАСУЛОВ**

### **РЕЗЮМЕ**

Описываются принципы и области применения метода полимеразно-цепной реакции. Представлены экспериментальные результаты по изучению мутаций  $\beta$ -талассемии и гена недостаточности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы методом высокотемпературной аллель-специфической амплификации у населения Кубинского и Хачмасского районов Азербайджанской Республики.

## **POLYMERASE CHAIN REACTION BASED DIAGNOSTIC METHODS AND AREAS OF THEIR USE**

**K.A.ALIYEVA, Z.F.AFANDIBAYLI, E.M.RASULOV, E.E.RASULOV**

### **SUMMARY**

The principle and areas of use for polymerase chain reaction are described. Experimental results on  $\beta$ -thalassaemia and glucose-6 phosphate-dehydrogenase mutations are studied by the amplification refractory mutation system method in the population of Guba and Khachmas regions of the Azerbaijan Republic .