

УДК 616.697:575.113

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МИКРОДЕЛЕЦИЙ AZF ЛОКУСА Y-ХРОМОСОМЫ

Каиржанова А.Д.¹, Абишева Г.Д.¹, Попова О.А.², Камалова Д.К.¹, Шевцова Е.С.¹,
Шевцов А.Б.¹

¹Национальный центр биотехнологии
Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан

²Астана ЭКОЛАЙФ
Шоссе Алаш, 22, Астана, 010000, Казахстан
apple_sk@mail.ru

АБСТРАКТ

Микроделеции длинного плеча Y хромосомы являются частой причиной нарушения сперматогенеза у мужчин. Частота встречаемости микроделеций AZF локуса составляет примерно 1 на 1000-1500 мужчин. Данные делеции Y хромосомы обнаруживают у 11% мужчин с азооспермией и у 8% мужчин с олигозооспермией тяжелой степени. Целью работы является разработка мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления микроделеций AZF локуса Y хромосомы. На основании литературных данных при разработке ПЦР протокола для скрининга микроделеций AZF локуса были использованы следующие STS маркеры: AZFa – sY86 и sY84, AZFb – sY127 и sY134, AZFc – sY254 и sY255. Для контроля присутствия в геномной ДНК фрагментов короткого плеча Y-хромосомы в разработанном протоколе используется последовательность SRY гена, а ZFY/X служит внутренним контролем ПЦР реакции. Апробация разработанного протокола была проведена на 40 образцах ДНК. В качестве альтернативного метода был использован протокол, рекомендованный Европейской Ассоциацией Андрологии. Идентичность результатов, полученных с использованием разрабатываемого и альтернативного протоколов, свидетельствует о специфичности разработанного протокола и его перспективности использования для разработки ПЦР тест-системы.

Ключевые слова: мужское бесплодие, ПЦР, микроделеция, AZF локус, Y хромосома, STS маркеры.

PROTOCOL DEVELOPMENT FOR THE DETECTION OF MICRODELETIONS IN THE AZF LOCUS OF THE Y CHROMOSOME

Kairzhanova A.D.¹, Abisheva G.D.¹, Popova O.A.², Kamalova D.K.¹, Shevtsova E.S.¹,
Shevtsov A.B.¹

¹National Center for Biotechnology
13/5, Korgalzhyn road, Astana, 010000, Kazakhstan

²Astana Ecolife
22, Alash road, Astana, 010000, Kazakhstan
apple_sk@mail.ru

ABSTRACT

Microdeletions in the long arm of the Y chromosome are common causes of male spermatogenesis disorders. The frequency of the AZF locus microdeletions is approximately 1 in 1000–1500 males. Such deletions of the Y chromosome are identified in 11% of males with azoospermia and in 8% of males with severe oligospermia. The aim of this study was to develop a multiplex polymerase chain reaction (PCR) protocol for the detection of microdeletions in the AZF locus of the Y chromosome. Based on the literature, the following sequence tagged site (STS) markers were used for development of the PCR protocol for screening the AZF locus microdeletions: AZFa-sY86 and sY84, AZFb-sY127 and sY134, AZFc-sY254 and sY255. As a control, the presence of Y chromosome short arm fragments in the genomic DNA were assessed using the SRY gene sequence and ZFY/X as an internal control of the PCR. Confirmation of the developed protocol was performed with 40 DNA samples. The protocol recommended by The European Academy of Andrology was used as a complementary method to confirm our results. The results from both methods indicate the specificity and high demand of the developed PCR protocol.

Key words: male infertility, PCR, microdeletion, AZF locus, Y chromosome, STS markers

ВВЕДЕНИЕ

Бесплодие – неспособность пары детородного возраста к зачатию, использующей в течение года незащищенный половой акт. Бесплодие является распространенной проблемой здравоохранения. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около 140 млн. человек во всем мире страдают данным недугом [1]. Прогнозируется, что в ближайшем будущем 1 из 6 пар, пытающихся зачать ребенка, будет иметь трудности с наступлением беременности. Около 15% сексуально активных пар являются бесплодными [2]. В этиологию бесплодия может быть вовлечен как женский, так и мужской организм. По некоторым оценкам, на долю мужского бесплодия приходится около 50% от общего количества бесплодных пар [3]. Иногда причины бесплодия очевидны, легко диагностируются, например, непроходимость маточных труб или семенных канальцев. Тем не менее, по-прежнему остается высокий процент идиопатических случаев, при которых невозможно определить причину бесплодия.

Термин «мужское бесплодие» не является определенно клиническим синдромом, скорее всего, это совокупность факторов, имеющих различную этиологию и различный диагноз. Есть известные и неизвестные (идиопатические) причины мужского бесплодия, на долю последних приходится примерно 30-50% всех случаев мужского бесплодия [4]. Многие ученые идиопатические случаи ассоциируют с генетическими факторами, недостаточно изученными в настоящее время [5].

Генетическое бесплодие может быть обусловлено изменениями на хромосомном и геномном уровнях. Основными генетическими факторами, участвующими в мужском бесплодии, являются хромосомные нарушения, а также мутационные изменения в генах [6].

Y-хромосома является основной мишенью при исследовании мужского бесплодия, потому что содержит гены, имеющие решающее значение в сперматогенезе и развитии мужских половых желез. Определение точной причины бесплодия, ассоциированного с Y-хромосомой, затруднительно ввиду полиморфизма генетических изменений, от точечных мутаций до протяженных делеций, зачастую затрагивающих область нескольких генов [7]. Кроме того, один и тот же фенотип может быть обусловлен различным спектром делеций и мутаций.

Микроделеции в длинном плече Y-хромосомы являются наиболее частой генетической причиной бесплодия у мужчин с нормальным кариотипом. Они выявляются в 10-15% случаях у мужчин с не obstructивной азооспермией и 5-10% при тяжелой олигозооспермии [8]. Однако процент выявления отличается между популяциями и может варьировать от 2 до 25% (рисунок 1) [9, 10]. Процент выявления микроделеций во многом зависит от предварительного скрининга пациентов и отбора пациентов, имеющих прямые показатели на анализ (азооспермия, олигозооспермия), в связи с чем в общих лабораториях осуществляющих диагностику микроделеций без контроля пациентов, процент выявления ниже.

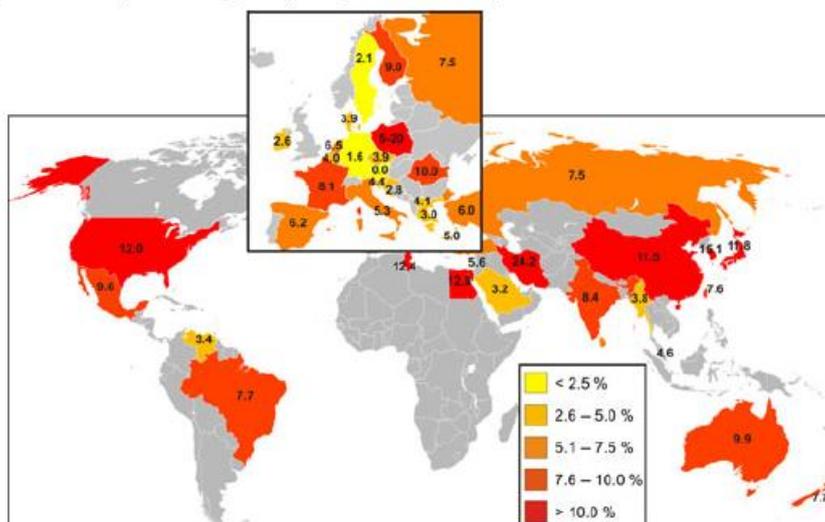
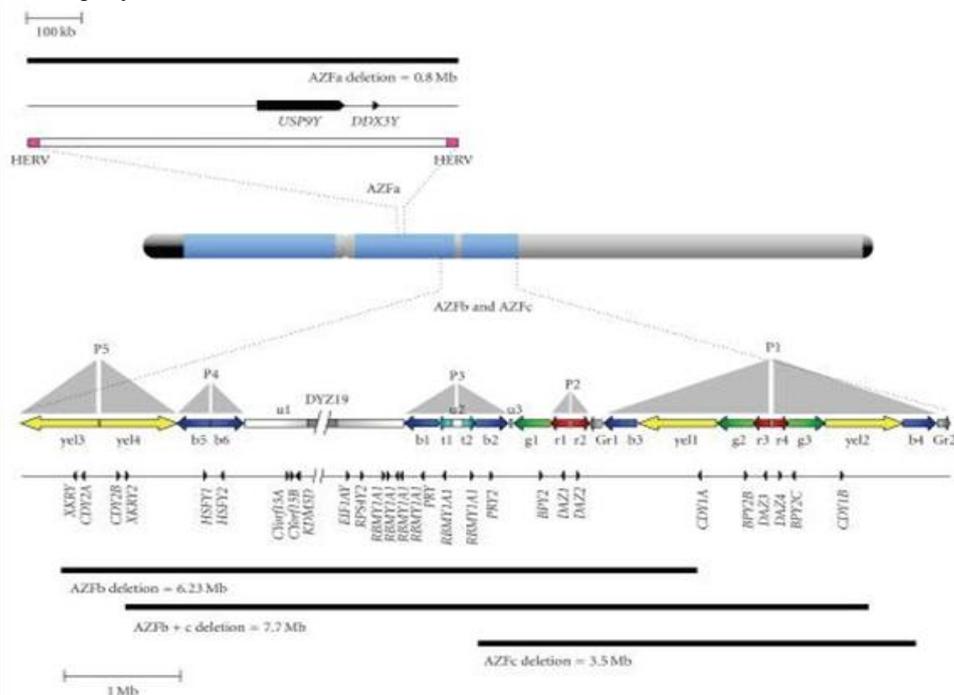


Рис. 1. Распределение микроделеций в популяциях

Fig. 1. Distribution of microdeletions in populations

Наибольший интерес исследователей сосредоточен на локусе Yq11, который содержит фрагмент генома, называемый областью фактора азооспермии (AZF область). Данный участок содержит гены, участвующие в росте и развитии сперматозоидов. Локус AZF содержит три субрегиона: AZFa, AZFb, AZFc [11]. Для каждого

из них выявлены гены-кандидаты, участвующие в контроле сперматогенеза, а также их X-сцепленные и/или аутосомные гомологи. Делеции, имеющие клинические проявления в виде тяжелой олигозооспермии и азооспермии, могут затрагивать один или более AZF локусов. Схематическое строение AZF регионов приведено на рисунке 2 [12].



выполняют различные роли на протяжении процесса сперматогенеза, потому что они выражены на всех этапах развития половых клеток. Они регулируют трансляцию, РНК-связывающие белки для кода зародышевых клеток и участвуют в контроле мейоза, а также поддерживают популяцию зародышевых клеток. Удаление генов DAZ может вызвать спектр фенотипов в пределах от олигозооспермии до азооспермии иногда с полным сохранением фертильности.

Исследования показывают, что только AZFa и AZFb регионы необходимы, чтобы инициировать сперматогенез, но без области AZFc сперматогенез не будет проходить полностью нормально [19].

Микроделеции слишком малы, чтобы диагностировать их при обычном кариотипировании, но они могут быть легко идентифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве мишеней для ПЦР используются STS маркеры (sequence tagged site, маркерная последовательность). Это относительно короткие уникальные последовательности, как правило, не встречающиеся в других регионах генома. Y-хромосома содержит 300 STS сайтов, часть из которых локализована в регионе AZF и используется для выявления микроделений в образцах ДНК, выделенных из цельной крови или спермы [20].

Идентификация микроделений Y-хромосомы имеет диагностическую, прогностическую и профилактическую значимость: наличие микроделений объясняет этиологию бесплодия и тем самым помогает избежать ненужных медицинских и хирургических процедур; у мужчин с азооспермией при наличии полных делеций AZFa или AZFb донорство спермы имеет прогностическое значение; пациенты с микроделециями локуса AZFc и олигозооспермией находятся в группе риска прогрессивного снижения концентрации сперматозоидов в течение долгого времени, криоконсервация сперматозоидов в будущем поможет избежать инвазивных методов, таких как экстракция тестикулярной спермы. Согласно рекомендациям международных экспертов, мужчины с диагнозом азооспермия и олигозооспермия тестируются на наличие микроделеции для точной диагностики и генетического консультирования перед выполнением вспомогательных репродуктивных технологий [21]. В настоящее время во многих странах мира выпускают диагностические тест-системы для выявления микроделений Y-хромосомы: Россия – ДНК технология (<http://dna-technology.ru/>), Литех (<http://www.lytech.ru/>); США – Thermo Fisher Scientific (<http://www.thermofisher.com/>) и другие. В основе наборов, как правило, используется ПЦР технология, а в качестве мишеней используются маркерные последовательности, рекомендованные международными ассоциациями андрологов.

Высокая диагностическая значимость и востребованность молекулярно-генетического тестирования микроделений Y-хромосомы актуализирует разработку отечественных тест-систем с использованием рекомендаций международных ассоциаций. В связи с этим целью данного исследования является разработка мультиплексного ПЦР протокола для генетического тестирования микроделений Y-хромосомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ДНК

Образцы ДНК были выделены из цельной крови, отобранной в вакуумные системы забора крови с антикоагулянтом ЭДТА от мужчин с бесплодием, имеющих прямые показатели для анализа микроделений локуса AZF Y-хромосомы и контрольной группы.

В выборку мужчин с бесплодием, имеющих прямые показатели для анализа микроделений локуса AZF Y-хромосомы, включали пациентов по результатам спермограммы, у которых был установлен диагноз азооспермия или олигозооспермия. В контрольную группу были включены мужчины, в спермограмме которых не было выявлено отклонений.

Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из периферической крови методом высаливания [22]. Принцип метода заключается в первичном лизисе ядер протеиназой K в SDS с последующим осаждением белков и липидов на кристаллах SDS, выпадающих в условиях высокой ионной силы хлорида натрия. Завершающий шаг – осаждение нуклеиновых кислот изопропанолом, очистка раствором 70% этанола и элюирование в TE буфере.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации

Анализ ПЦР продуктов проводили методом электрофоретического разделения фрагментов ДНК в 3% агарозном геле, в присутствии интеркалирующего агента – бромистого этидия. Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза PowerPac с источником тока BioRad Electrophoretic bath (Bio-Rad, США). В качестве электродного буфера использовали 1xTAE-буфер (40 mM Трис-основной, 20 mM уксусной кислоты, 1 mM ЭДТА).

Документирование полученных результатов проводили, используя систему документаций гелей Gel Doc, (Bio-Rad, США), с программным обеспечением Quantity One (Bio-Rad, США). Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности в геле с подвижностью

маркеров – фрагмент ДНК известной молекулярной массы. В качестве маркера молекулярных масс использовали «DNA Ladder 1kb» (Ferments).

Дизайн и конструирование праймеров

Подбор специфических праймеров проводили с использованием программ Primer Select (DNASTAR) и BioEdit. В качестве мишеней были использованы STS маркеры, рекомендованные Европейской ассоциацией андрологов [9]: AZFa – sY86 и sY84, AZFb – sY127 и sY134, AZFc – sY254 и sY255, для контроля фрагмента короткого плеча Y-хромосомы была выбрана нуклеотидная последовательность *SRY* гена, а в качестве внутреннего контроля была использована нуклеотидная последовательность *ZFX/ZFY* генов, локализованных на X и Y хромосомах соответственно.

Референтный метод выявления микроделечий

В качестве альтернативного метода выявления микроделечий AZF локуса в образцах ДНК от мужчин, имеющих прямые показатели для анализа микроделечий локуса AZF Y-хромосомы и контрольной группы, использовался протокол, рекомендуемый Европейской ассоциацией андрологов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 21 веке анализ ДНК становится неотъемлемой частью исследования мужского бесплодия, ассоциированного с микроделечиями Y-хромосомы. При этом формат ПЦР реакции может сводиться к обычному ПЦР, который позволяет амплифицировать единственную ДНК мишень или к мультиплексному формату, позволяющему одновременно выявлять до 19 мишеней. Мультиплексный ПЦР нашел широкое применение в научных и клинических исследованиях микроорганизмов, экспрессии генов, судебно-медицинской экспертизе и ДНК «дактилоскопии». В настоящее время в скрининговом исследовании микроделечий Y-хромосомы чаще всего используется мультиплексный вариант ПЦР [23]. Внедрение и последующая коммерциализация ПЦР тест-систем требует от разработчиков наличия интеллектуальных прав, поэтому производители разрабатывают свои наборы, опираясь только на выбор генетических маркеров, рекомендованных международными ассоциациями.

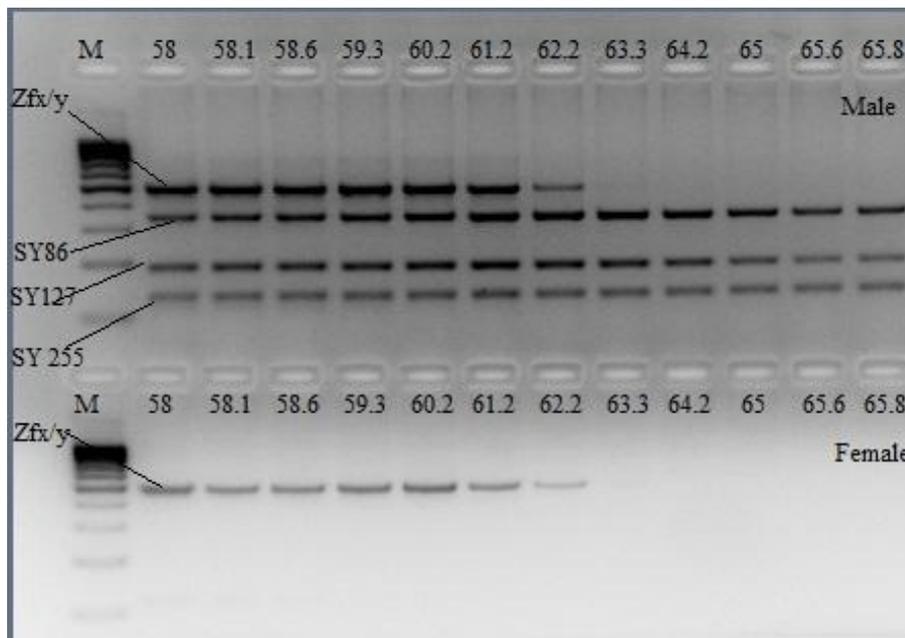
В нашем исследовании в качестве генетических маркеров были выбраны 6 STS маркеров, рекомендованных Европейской ассоциацией андрологов для скрининга микроделечий и 2 контрольных гена для контроля ингибирования реакции и наличия Y-хромосомы. К выбранным STS маркерам были подобраны праймеры. Для каждого STS из международной базы данных NCBI были взяты по 7-15 референтных последовательностей, которые были выровнены с использованием программного обеспечения BioEdit, к консервативным участкам были подобраны праймеры. При подборе праймеров учитывали основные параметры: длина праймеров от 18-25 п.н, низкая вероятность образования вторичных структур. Праймеры были подобраны с учетом последующего мультипликсирования ПЦР тест-системы, поэтому праймеры обладают близкой расчетной температурой отжига и амплифицируемые фрагменты отличаются по молекулярной массе. Синтез праймеров был осуществлен в РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК.

Подобранные праймеры были комбинированы в две панели – А и G. Панель А включала в себя 3 пары праймеров к селективным маркерам микроделечий, AZFa (sY86 – размер амплифицируемого продукта 326 пар нуклеотидов (п.н.), AZFb (sY127 – 199 п.н.), AZFc (sY255 – 132 п.н.), в качестве внутреннего контроля использовались праймеры к *ZFX/Y* (506 п.н.). Панель G включала праймеры к маркерам микроделечий AZFa (sY84 – 244 п.н.), AZFb (sY134 – 303 п.н.), AZFc (sY254 – 186 п.н.) и для контроля фрагмента короткого плеча Y-хромосомы были использованы праймеры, подобранные к STS маркеру sY14, локализованного в *SRY* гене (470 п.н.).

Мультиплексирование ПЦР реакции требует оптимизации состава реакционной смеси с включением присадок, повышающих эффективность и специфичность ПЦР. На основании анализа литературных данных, для повышения стабильности полимеразы и эффективности амплификации были выбраны бетаин и тетраметиламмония хлорид в низкой концентрации. Повышение вязкости реакционной смеси было достигнуто с добавлением сахарозы [24].

На первом этапе разработки ПЦР протокола была проведена оптимизация концентрации магния и температуры отжига праймеров, так как эти показатели оказывают наибольшее влияние на специфичность и эффективность ПЦР [25]. Несмотря на обилие программного обеспечения по определению температуры отжига праймеров, в реальных условиях приходится подбирать температуру отжига опытным путем. Из-за высокой разницы в расчетной температуре плавления с использованием двух пакетов программного обеспечения Beacon Designer 8.2 (Premier Biosoft) и Primer Select (DNAStar), при оптимизации условий ПЦР был использован интервал температур от 58°C до 66°C. Таким образом, программа ПЦР амплификации включала: горячий старт 95°C, длительную денатурацию 95°C в течение 4 минут; 35 циклов: 95°C – 35 секунд, 58-66°C – 1 минута 30 секунд, 72°C – 1 минута; финальная элонгация 72°C – 10 минут. Оптимизацию проводили с использованием Mastercycler PROS (Eppendorf).

В состав реакционной смеси входили: праймер-микс по 4 пмоль каждого праймера; ДНК 100 нг; 5 Ед. 0,2 мМ каждого дНТФ; 1хПЦР буфер (75 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v/v) Tween 20); ионы магния 3,0 мМ, 5 нМ тетраметиламмония хлорида, 7% сахарозы, ксилен цианол 10 мг/мл, бетаин – до финальной концентрации 0,2М, 3 Ед. Taq ДНК полимеразы (РГП «Национальный центр биотехнологии»). Образец ДНК мужчины, в котором не выявлены микроделеции с использованием протокола Европейской ассоциации урологов, служил в качестве положительного контроля. ДНК женщины была использована в качестве оценки специфичности отжига праймеров на аутосомах и X-хромосоме. Пример оптимизации температуры отжига праймеров, входящих в панель А, приведен на рисунке 3.



M – молекулярный маркер 100 bp; 58-65,8 – температурный градиент °C
ZFX/Y (506 п.н.) *AZFa* (sY86 – 326 п.н.), *AZFb* (sY127 – 199 п.н.), *AZFc* (sY255 – 132 п.н.)

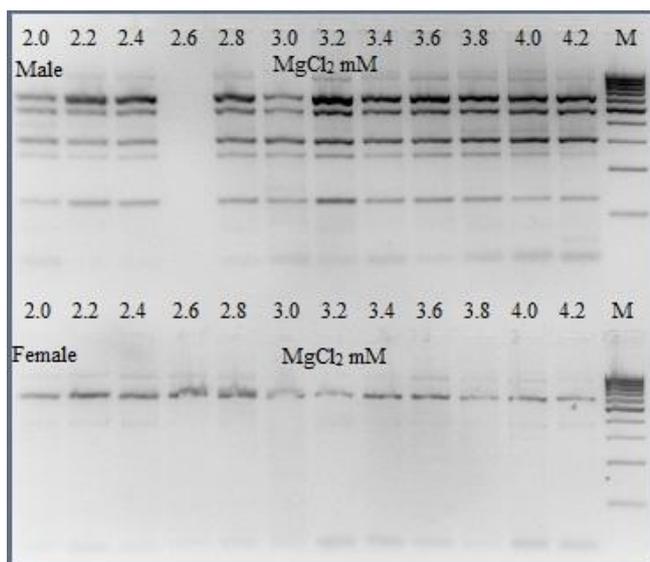
Рис. 3. Оптимизация условий панели А в градиенте температур

M – molecular marker 100 bp; 58-65,8 – temperature gradient
ZFX/Y (506 bp.) *AZFa* (sY86 – 326 bp.), *AZFb* (sY127 – 199 bp.), *AZFc* (sY255 – 132 bp.)

Fig. 3. Optimization of the panel A conditions in temperature gradients

Как видно на рисунке 3, специфические ПЦР продукты амплификации маркеров sY127, sY255, sY86 и *ZFX/Y* образуются при температурах от 58° до 62,2°C, в образцах, содержащих ДНК мужчины. Наибольший выход ПЦР продуктов наблюдается при низких температурах (58-60,2°C). Об этом свидетельствует более высокая интенсивность окраски целевых бендов. В нижней части рисунка представлены результаты ПЦР амплификации с использованием ДНК женщины. Видно, что в градиенте температур от 58 до 62°C амплифицируется только фрагмент *ZFX* гена, что свидетельствует о высокой специфичности подобранных праймеров. На основании полученных результатов было установлено, что оптимальная температура отжига составляет 60°C.

После того как были определены оптимальные временные и температурные условия амплификации, проводили эксперименты по оптимизации содержания магния в реакционной смеси. Концентрация хлорида магния влияет на отжиг праймеров и денатурацию образца. Однако его избыток может вызывать образование неспецифических продуктов. Оптимальные концентрации подбираются эмпирическим путем в процессе оптимизации условий реакции. Результаты этих исследований представлены на рисунке 4.



1 банд – zfx-y (размером 591 bp); 2 – SY14 (470 bp); 3 – SY 134 (303 bp); 4 – SY 84 (244 bp); 5 – SY 254 (186 bp). (ПЦР-смесь в лунке с концентрацией магния 2,6 испарилась)

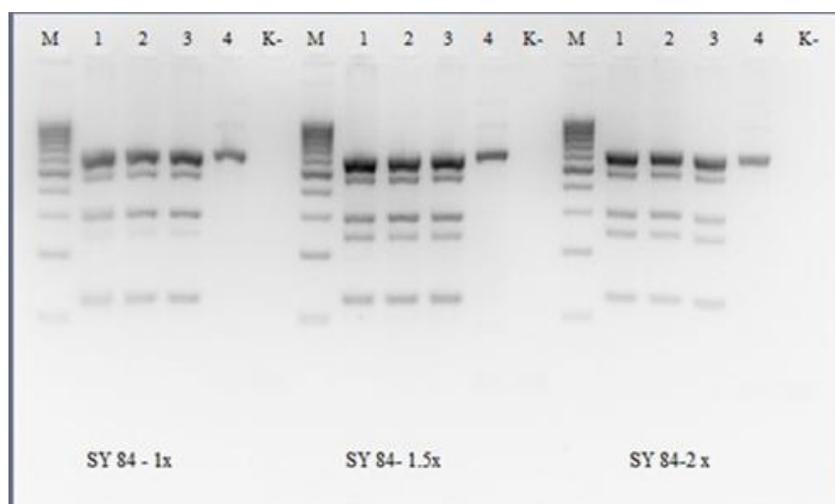
Рис. 4. Оптимизация концентрации $MgCl_2$ на панели G

First band – zfx-y (size 591 bp); 2 – SY14 (470 bp); 3 – SY 134 (303 bp); 4 – SY 84 (244 bp); 5 – SY 254 (186 bp). (PCR mix in the well with $MgCl_2$ 2,6 evaporated)

Fig. 4. Optimization of $MgCl_2$ concentration in panel G

Из рисунка 4 следует, что изменение концентрации соли в пределах от 2,0 до 4,2 мМ влияет на процесс амплификации. Выход специфических ПЦР продуктов был обнаружен при всех концентрациях магния. Однако, значения магния в диапазонах 2,8-3,2 мМ приводят к более высокому выходу ПЦР продуктов, что можно наблюдать по наибольшей интенсивности окраски бэндв. На основании полученных опытных данных в дальнейших экспериментах при проведении ПЦР для приготовления реакционных смесей использовали концентрацию соли магния 2,8 мМ.

Как видно на рисунке 4, интенсивность свечения маркера sY84 ниже остальных, что, возможно, связано с различием в эффективности амплификации [26]. Для компенсации низкой эффективности амплификации данного маркера была проведена оптимизация концентрации праймеров в реакционной смеси. Результаты представлены на рисунке 5.



M – маркер 100 bp; 1-3 – образцы мужчины; 4 – образец женщины; K – отрицательный контроль (вода)

Рис. 5. Увеличение концентрации праймера SY 84

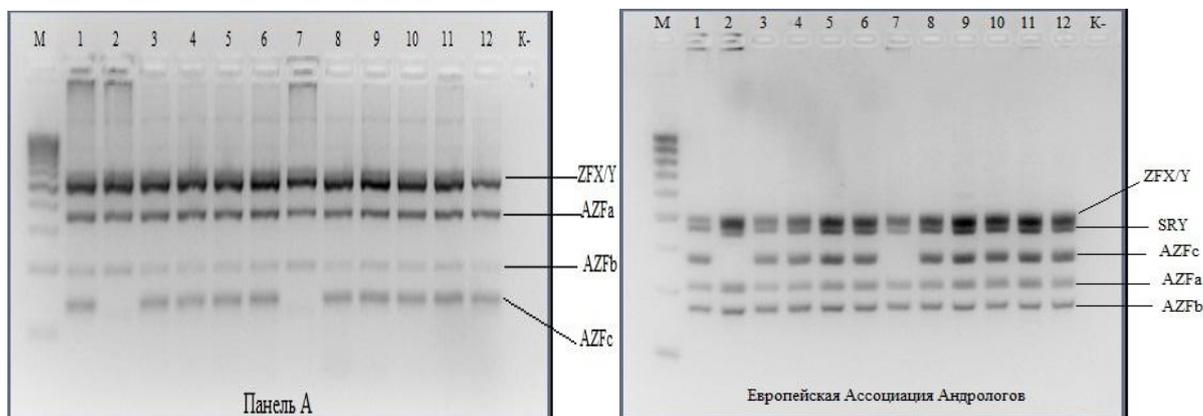
M – marker 100bp; 1-3 – male samples; 4 – female samples; K – negative control (water)

Fig. 5. Increased concentration of primer SY 84

Из результатов, приведенных на рисунке 5, видно, что оптимальным является увеличение концентрации праймеров SY 84 в 1,5 раз, то есть до 15 пмоль в реакционной смеси.

В результате проведенных исследований была подобрана оптимальная концентрация реакционной смеси и праймеров для постановки ПЦР следующего состава: праймер-микс по 4 пмоль каждого за исключением праймеров SY 84 (15 пмоль); ДНК 100 нг; 0,2 мМ каждого дНТФ; 1хПЦР буфер (75 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v/v) Tween 20); ионы магния 2,8 мМ, 5 нМ тетраметиламмония хлорида, 7% сахарозы, ксилен цианол 10 мг/мл, бетаин – до финальной концентрации 0,2М, 3 единицы Taq ДНК полимеразы (РГП «Национальный центр биотехнологии»). Программа ПЦР амплификации включала: горячий старт 95°C, длительную денатурацию 95°C в течение 4 минут; 35 циклов: 95°C – 35 секунд, 60°C – 1 минута 30 секунд, 72°C – 1 минута; финальная элонгация 72°C – 10 минут.

Для проверки достоверности разрабатываемого протокола было проведено сличительное исследование 40 образцов ДНК, выделенных из цельной крови от мужчин с известной спермограммой. В качестве альтернативного метода был использован протокол Европейской ассоциации андрологии. Результаты двух панелей представлены на рисунке 6.



M – маркер 100 bp; 1-12 – образцы мужчин; K – отрицательный контроль (вода)

Рис. 6. Сравнительный анализ разрабатываемого протокола с протоколом Европейской ассоциации андрологов

M – marker 100bp; 1-12 – male samples; K – negative control (water)

Fig. 6. Comparative analysis of the developed protocol and protocol of the European Andrology Association

На рисунке 6 видно, что в образцах 2 и 7 отсутствует специфическая полоса молекулярной массой 186 п.н., свидетельствующая о микроделеции AZFc (sY254). Важно отметить, что такой же результат был получен при использовании протокола Европейской ассоциации андрологов. В результате исследований 40 образцов ДНК у двух пациентов с азооспермией была установлена микроделеция AZFc. Результаты разработанного протокола полностью совпали с результатами протокола, рекомендованного Европейской ассоциацией андрологов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный протокол обнаружения микроделений Y-хромосомы позволяет установить генетическую причину нарушения сперматогенеза, избежать необоснованного лечения бесплодия у мужчин с микроделениями локуса AZF, а также прогнозировать вероятность получения сперматозоидов для проведения ЭКО/ИКСИ. Разработанный протокол перспективен для последующей разработки ПЦР тест-системы для обнаружения микроделений.

Финансирование

Работа выполнялась в рамках проекта «Разработка тест-системы для выявления микроделений локуса AZF Y хромосомы» в рамках реализации в государственного заказа по бюджетной программе «Промышленные биотехнологии».

ЛИТЕРАТУРА

1. Esteves S.C. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2013. – Vol. 6. – P. 176-182.
2. Rowe P.J., Comhaire F.H. WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple. – Cambridge: Cambridge University, 2000.
3. Farhi J., Ben-Haroush A. Distribution of causes of infertility in patients attending primary fertility clinics in Israel // *Isr. Med. Assoc.J.* – 2011. – Vol. 13, №1. – P. 51-54.
4. Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S. *Andrology: male reproductive health and dysfunction* // Springer; Heidelberg. – New York, 2010. – P. 577-587.
5. Черных В.Б., Курило Л.Ф., Гоголевская И.К. и др. Комплексное клинико-генетическое обследование пациентов с азооспермией или олигозооспермией неясной этиологии // *Проблемы репродукции.* – 2001. – №3. – С. 58-63.
6. Scriven P.N., Flinter F.A., Braude P.R., Ogievie C.M. Robertsonian translocations-reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis // *Hum.Reprod.* – 2001. – Vol. 16. – P. 2267-2273.
7. Reynolds N., Cooke H.J. Role of the DAZ genes in male fertility // *Reprod Biomed Online* – 2005. – Vol. 10. – P. 72-80.
8. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis // *Endocrine Reviews* – 2001. – Vol. 22. – P. 226-329.
9. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 // *Andrology.* – 2014. – Vol. 2. – P. 5-19.
10. Simoni M., Tüttelmann F., Gromoll J., Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience // *Reprod Biomed Online.* – 2008. – Vol. 16. – P. 289-303.
11. Vogt P.H. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis // *Reprod. Biomed. Online.* – 2005. – Vol. 10. – P. 81-93.
12. Navarro-Costa P., Plancha C., Gonçalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* – 2010. – Vol. 16. – P. 525-542.
13. Krausz C. Y chromosome and male infertility: update // *Degl. Innocenti. S. Front. Biosci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 3049-3061.
14. Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. Male infertility: role of genetic background // *Reprod. Biomed. Online.* – 2007. – Vol. 14. – P. 734-45.
15. Nuti F., Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis // *Reprod. Biomed. Online.* – 2008. – Vol. 16. – P. 504-13.
16. Brown G.M., Furlong R.A., Sargent C.A., Erickson R.P., Longepied G., Mitchell M. et al. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – №7 – P. 97-107.
17. Ferlin A., Arredi B., Speltra E., Cazzadore C., Selice R., Garolla A. et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy // *Journal Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92. – P. 762-770.
18. Ferlin A., Moro E., Garolla A., Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14. – P. 1710-1716.
19. Georgiou I., Syrrou M., Pardalidis N., Karakitsios K., Mantzavinos T., Giotitsas N. et al. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method // *Asian. J. Androl.* – 2006. – Vol. 8. – P. 643-673.
20. Hellani A., S. Al-Hassan et al. Y chromosome microdeletions: are they implicated in teratozoospermia? // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 2. – P. 3505-3509.
21. Sadeghi-Nejad H., Farrokhi F. Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions // *Urol J.* – 2007. – Vol. 4, №4. – P. 192-206.
22. Miller S.A., Dykes D., Polesky H.F. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – Vol. 16. – P. 1215.
23. Zheng H.Y., Li Y., Shen F.J., Tong Y.Q. A novel universal multiplex PCR improves detection of AZFc Y-chromosome microdeletions // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2014. – Vol. 31, №5. – P. 613-620.
24. Шевцов А.Б., Каиржанова А.Д., Абишева Г.Д. и др. Разработка ПЦР-теста для видовой идентификации *S. coli*, *S. jejuni*, *S. Fetus* // *Биотехнология теория и практика.* – 2014. – №3. – С 54-60.
25. Roux K.H. Cold Optimization and troubleshooting in PCR // *In Spring Harbor protocols.* – New York: Spring, 2009. – P. 380.

26. Gunson R.N., Bennett S., Maclean A., Carman W.F. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service // *J. Clin Virol.* – 2008. – Vol. 43, №4. – P. 372-375.

REFERENCES

1. Esteves S.C. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *J. Hum Reprod Sci*, 2013, vol. 6, pp. 176-82. doi: 10.4103/0974-1208.121419.
2. Rowe P.J., Comhaire F.H. WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge: Cambridge University, 2000.
3. Farhi J., Ben-Haroush A. Distribution of causes of infertility in patients attending primary fertility clinics in Israel *Isr. Med. Assoc. J.*, 2011, vol. 13, no 1, pp. 51-54. PMID: 21446238.
4. Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S. *Andrology: male reproductive health and dysfunction.* Springer; Heidelberg; New York, 2010, pp. 577-587.
5. Chernih V.B., Kurilo L.F., Gogolevskaya I.K. et al. Complexnoe clinic-geneticheskoe bsledovanei pacientov c azoospermiey ili oligozoospermiey neyasnoi etiologii [Complex clinical-genetic examination of patients with azoospermia or oligozoospermia unknown etiology]. *Problemi reprodukcii – Reproduction problems*, 2001, no 3, pp. 58-63.
6. Scriven P.N., Flinter F.A., Braude P.R., Ogivie C.M. Robertsonian translocations-reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Hum.Reprod*, 2001, vol. 16, pp. 2267-2273. PMID:11679502.
7. Reynolds N., Cooke H.J. Role of the DAZ genes in male fertility. *Reprod Biomed Online*, 2005, vol. 10, pp. 72-80. PMID: 15705297.
8. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 2001, vol. 22, pp. 226-329. PMID:11294825.
9. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2014, vol. 2, pp. 5-19. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x.
10. Simoni M., Tüttelmann F., Gromoll J., Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience. *Reprod Biomed Online*, 2008, vol. 16, pp. 289-303. PMID:18284889.
11. Vogt P.H. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, vol. 10, pp. 81-93. PMID: 15705299.
12. Navarro-Costa P., Plancha C., Gonçalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, vol. 16, pp. 525-542. PMID: 20671934.
13. Krausz C. Y chromosome and male infertility: update. *Degl. Innocenti. S.Front. Biosci*, 2006, vol. 11, pp. 3049-3061. PMID:16720375.
14. Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. Male infertility: roleofgenetic background. *Reprod. Biomed. Onlin*, 2007, vol. 14, pp. 734-45. PMID: 17579990.
15. Nuti F., Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online*, 2008, vol. 16, pp. 504-13. PMID: 18413059.
16. Brown G.M., Furlong R.A., Sargent C.A., Erickson R.P., Longepied G., Mitchell M. et al. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum. Mol. Genet*, 1998, no 7, pp. 97-107. PMID: 9384609.
17. Ferlin A., Arredi B., Speltra E., Cazzadore C., Selice R., Garolla A. et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *Journal Clin. Endocrinol. Metab*, 2007, vol. 92, pp. 762-70. PMID: 17213277.
18. Ferlin A., Moro E., Garolla A., Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum. Reprod*, 1999, vol. 14, pp. 1710-1716. PMID:10402373.
19. Georgiou I., Syrrou M., Pardalidis N., Karakitsios K., Mantzavinos T., Giotitsas N. et al. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian. J. Androl*, 2006, vol. 8, pp. 643-673. doi: 10.1111/j.1745-7262.2006.00231.x.
20. Hellani A., S.Al-Hassan et al. Y chromosome microdeletions: are they implicated in teratozoospermia? *Hum. Reprod*, 2005, vol. 2, pp. 3505-3509. PMID:16123092.
21. Sadeghi-Nejad. H. and Farrokhi F. Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions. *Urol J.*, 2007, vol. 4, no 4, pp. 192-206. PMID:18270942.
22. Miller S.A., Dykes D., Polesky H.F. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16, pp. 1215. doi: 3344216.
23. Zheng H.Y., Li Y., Shen F.J., Tong Y.Q. A novel universal multiplex PCR improves detection of AZFc Y-chromosome microdeletions. *J Assist. Reprod. Genet*, 2014, vol. 31, no 5, pp. 613-620. doi: 10.1007/s10815-014-0204-5.

24. Shevtsov A.B., Kairzhanova A.D., Abisheva G.D. et al. Razrabotka pcr testa dlya vidovoi identifikatsii C. coli, C. jejuni, C. fetus. [Development pcr test for specific identification c. Coli, c. Jejuni, c. Fetus]. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika – Biotechnology. Theory and Practice*, 2014, no 3, pp. 54-60. doi: 10.11134/btp.3.2014.8.gy.

25. Roux K.H. Cold Optimization and troubleshooting in PCR. *Spring Harbor protocols*, 2009, pp. 380. doi: 10.1101/pdb.ip66.

26. Gunson R.N., Bennett S., Maclean A., Carman W.F. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service. *J. Clin Virol*, 2008, vol. 43, no 4, pp. 372-375. doi:10.1016/j.jcv.2008.08.020.

У ХРОМОСОМАСЫНЫҢ AZF ЛОКУСЫНДАҒЫ МИКРОДЕЛЕЦИЯЛАРДЫ АНЫҚТАУҒА АРНАЛҒАН ХАТТАМА ӘЗІРЛЕУ

Қайыржанова А.Д.¹, Әбішева Г.Д.¹, Попова О.А.², Камалова Д.К.¹, Шевцова Е.С.¹,
Шевцов А.Б.¹

¹Ұлттық биотехнология орталығы

Қорғажын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

²Астана ЭКОЛАЙФ

Алаш тас жолы, 22, Астана, 010000, Қазақстан

apple_sk@mail.ru

ТҮЙІН

У хромосомасының ұзын иығының микроделециялары еркектерде сперматогенез бұзылуының жиі кездесетін себебі болып табылады. AZF локусы микроделецияларының кездесу жиілігі шамамен 1000-1500 еркекке 1-ді құрайды. У хромосомасы делециясының белгілері еркектердің 11%-ында азооспермия және еркектердің 8%-ында олигозооспермияның ауыр түрінде білінуде. Жұмыстың мақсаты У хромосомасы AZF локусының микроделецияларын анықтау үшін мультиплекстік полимеразалы тізбектік реакциясын әзірлеу болып табылады. Әдеби деректер негізінде ПТР хаттамасын әзірлеу кезінде AZF локусы микроделецияларының скринингі үшін мынадай STS маркерлері пайдаланылды: AZFa – sY86 және sY84, AZFb – sY127 және sY134, AZFc – sY254 және sY255. Геномды ДНҚ-да У-хромосомасының қысқа иық фрагменттерінің қатысуын бақылау үшін әзірленген хаттамада SRУ генинің жүйелілігі пайдаланылады, ал ZFY/X ПТР реакциясының ішкі бақылауы қызметін атқарады. Әзірленген хаттама 40 ДНҚ үлгісінде сыналды. Балама әдіс ретінде Андрологияның Еуропалық Қауымдастығы ұсынған хаттама пайдаланылды. Әзірленген және балама хаттаманы пайдалану арқылы алынған нәтижелердің сәйкестігі әзірленген хаттаманың ерекшелігін және оны ПТР тест-жүйесін әзірлеу үшін пайдаланудың келешегі зор екендігін айғақтайды.

Негізгі сөздер: еркек бедеулігі, ПТР, микроделеция, AZF локус, У хромосома, STS маркерлер.