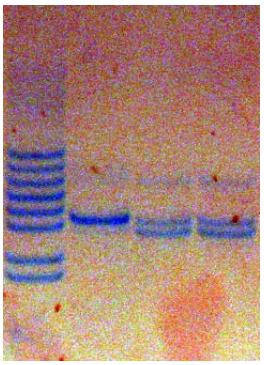
UGT1A1-STR

Условия ПЦР

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Детекция результатов

1) Электрофорез в полиакриламидных гелях (ПАГ) – скрининговый тест;
2) Секвенирование продуктов ПЦР – подтверждающий тест (при необходимости).

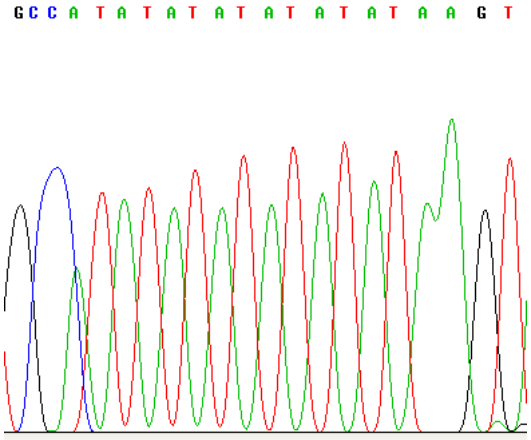


Фрагмент окрашенного бромистым этидием неденатурирующего ПАГ (10%, 19:1). Электрофорез проводился в вертикальной камере 20x20 см (VE-20, «Хеликон», Россия) с буфером *1X ТБЕ* при напряжении 600В в течение трёх часов (до достижения красителем ксиленцианол нижнего края геля).

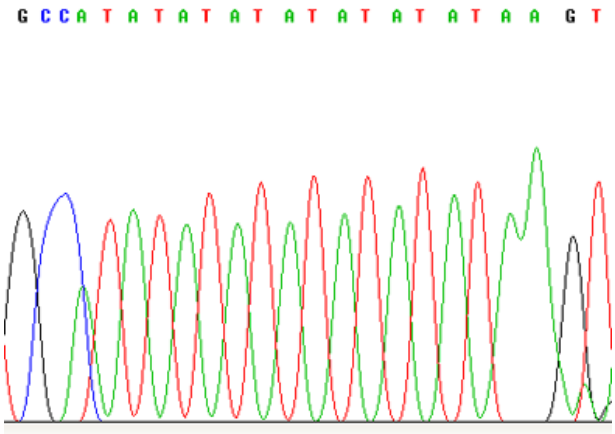
Дорожка 1 – аллельная “лестница” на локус *D22S1045* с шагом между аллелями 3 п.н., от 88 до 112 п.н.

Дорожка 2 – исследуемый образец по локусу *UGT1A1-STR,* «мутантный» генотип 7/7 (99 п.н.).

Дорожки 3 и 4 – исследуемые образцы по локусу *UGT1A1-STR,* гетерозиготный генотип 6/7 (97 и 99 п.н.).



Фрагмент нуклеотидной последовательности микросателлита *UGT1A1-STR* для **«нормального»** гомозиготного генотипа 6/6 (ДНК K562).
Структура повтора: A-(TA)$_6$-TAA.
Результат секвенирования продукта ПЦР размером 97 п.н.



Фрагмент нуклеотидной последовательности микросателлита *UGT1A1-STR* для **«мутантного»** гомозиготного генотипа 7/7.
Структура повтора: A-(TA)$_7$-TAA.
Результат секвенирования продукта ПЦР размером 99 п.н.

Длина тандемного повтора: *2 нуклеотида (TA).*

Другие названия: *UGT1A-TA insertion in promoter, UGT1A1*28, UGT1A1*36, UGT1A1*37.*

Хромосомная локализация: *2q37.1 (позиции 233 760 200 – 233 760 300)*

По данным *BLAT:* https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat (версия Dec.2013, GRCh38/hg38).

Референтные генотипы

ДНК L-68	***ДНК 9948***	***ДНК 9947A***	***ДНК 007***	***ДНК K562***	***ДНК 2800M***	***ДНК CO***
6 / 7	**6 / 7**	6 / 6 (WT)	6 / 6 (WT)	6 / 6 (WT)	6 / 6 (WT)	6 / 6 (WT)

Референтные нуклеотидные последовательности

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемных повторов в референтной последовательности	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
AY533180	21-JAN-2005	a-$(TA)_7$-taa	99
NG_033238	23-FEB-2014	a-$(TA)_6$-taa	97

AY533180: “Homo sapiens uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene, promoter region”.

NG_033238: “Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1), RefSeqGene on chromosome 2”.

GC-состав ПЦР-продукта: 41% (для аллеля «дикого» типа, с шестью повторами).

Общие сведения и диагностическая значимость

Микросателлит *UGT1A1-STR* (*rs8175347*) расположен в промоторном участке первого экзона гена, кодирующего цитоплазматический фермент *уридиндифосфатглюкуронилтрансферазу 1* (УДФГТ, УДФ-глюкуронидаза 1, *UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1*). Этот фермент играет ключевую роль в глюкуронизации (связывании с глюкуроновой кислотой) ряда гидрофобных эндогенных соединений: в первую очередь – билирубина, а также стероидных гормонов, желчных кислот, ксенобиотиков (лекарственные препараты, канцерогены). Глюкуронизация делает такие соединения растворимыми в воде, что обеспечивает их переход в желчь и выведение из организма с мочой.

Применительно к метаболизму свободного билирубина, недостаточная активность фермента УДФГТ приводит к повышению концентрации билирубина в крови и, как следствие, накоплению его в тканях организма (гипербилирубинемия; синдром Жильбера, СЖ, Gilbert syndrome, OMIM: 143500; синдром Криглера-Найара, Crigler-Najjar syndrome type I and II, OMIM: 218800, 606785; желтуха новорожденных семейная, transient familial neonatal hyperbilirubinemia, OMIM: 237900). В настоящее время для этих заболеваний полагается утосомно-рецессивный тип наследования (*Chowdhury et al., 2001*).

Снижение активности фермента УДФГТ может быть обусловлено различными мутациями в гене *UGT1A* (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A complex locus; NCBI Gene ID: 7361). Размер гена *UGT1A* составляет около 200 тыс. оснований, при этом он содержит девять альтернативных первых экзонов, которые обозначаются как *UGT1A1, UGT1A3-UGT1A10* (*PharmGKB, Whirl-Carrillo et al., 2012*).

В 1995 г. было показано, что мутация в промоторном участке гена *UGT1A1* является необходимой, но недостаточной для полной манифестации СЖ (*Bosma et al., 1995*). Эта мутация, снижающая активность фермента УДФГТ, представляет собой вставку двух нуклеотидов в ТАТА-боксе промотора гена: «нормальная» последовательность A$(TA)_6$TAA трансформируется в последовательность A$(TA)_7$TAA. При этой мутации транскрипционная активность гена снижается примерно до 70% от нормы (*Bosma et al., 1995; Tukey et al., 2002*).

К настоящему времени для микросателлита *UGT1A1-STR* показано существование не менее четырёх аллелей: A$(TA)_6$TAA («дикого типа», wild type – WT, *UGT1A1*1*), A$(TA)_7$TAA (наиболее частый мутантный, *UGT1A1*28*), а также аллелей $(TA)_5$ (*UGT1A1*36*) и $(TA)_8$ (*UGT1A1*37*) (*Beutler et al., 1998; Farrar et al., 2011; Premawardhena et al., 2003*). При этом активность фермента УДФГТ находится в обратной зависимости от числа повторов (*Farrar et al., 2011*).

Частота мутантного аллеля *UGT1A1*28* в различных популяциях следующая: 26-39% для европеоидов, 9-33% – для азиатских популяций, 40-56% для негритянских популяций (*Beutler et al., 1998; Farrar et al., 2011; Fertrin et al., 2002; Kaniwa et al., 2005; Lampe et al., 1999; PharmGKB*).

Другие мутантные аллели, *UGT1A1*36* и *UGT1A1*37,* обнаружены главным образом в негритянских популяциях, с частотами от 2 до 16% (*Beutler et al., 1998; Farrar et al., 2011; Pacheco et al., 2009; PharmGKB; Premawardhena et al., 2003*).

Данные о полиморфизме микросателлита *UGT1A1-STR* в популяциях России в настоящее время представлены отрывочно, но при этом выявлены все четыре известных аллеля (*Захарова и др., 2011; Куропаткина и др., 2005; Шаталова и др., 2006*).

Исходя из хромосомной локализации, микросателлит *UGT1A1-STR* может быть сцеплен с полиморфным локусом *D2S1338* (используется в приложениях по идентификации личности).

Применительно к диагностике синдрома Жильбера, всем детям с гипербилирубинемией и подозрением на СЖ рекомендуется проводить генетическое исследование как приоритетное (*Захарова и др., 2011*). Если при проведении такого молекулярно-генетического исследования для микросателлита *UGT1A1-STR* выявляются генотипы 7/7, 8/8 и 7/8 (два последних генотипа – весьма редко), то полученный результат подтверждает снижение функциональной активности фермента УДФГТ и подтверждает диагноз СЖ.

Если при проведении исследования выявляется генотип 6/7 (в гетерозиготном состоянии), то полученный результат также подтверждает снижение функциональной активности фермента УДФГТ. Однако полученные результаты в этом случае уже не позволяют однозначно ни подтвердить, ни опровергнуть диагноз СЖ, поскольку аллель 7 в гетерозиготном состоянии с высокой частотой встречается и у здоровых людей.

Молекулярно-генетический анализ *UGT1A1-STR* также показан для пациентов, которым планируется лечение рядом лекарственных препаратов, в частности: атазанавиром, иринотеканом (на уровне подбора оптимальных доз этих препаратов в зависимости от генотипа по *UGT1A1-STR,* ***Dosing Guidelines****)*, а также арформотеролом, акситинибом, белиностатом, клобазамом, нилотинибом и др. (на уровне ***annotated drug labels***, по данным *PharmGKB*).

Например, иринотекан (irinotecan, camptosar, campto) в настоящее время является основным препаратом для лечения колоректального рака (первая линия химиотерапии), а также рака яичников и мелкоклеточного рака лёгкого (вторая линия). Активный метаболит иринотекана, SN38, является субстратом фермента УДФГТ. Для снижения риска токсических проявлений химиотерапии (в частности – тяжёлой нейтропении и диареи) рекомендуется уменьшение дозы иринотекана для пациентов с гомозиготным генотипом *UGT1A1*28/*28*, даны и другие рекомендации (*Innocenti et al., 2004; Etienne-Grimaldi et al., 2015*).

Препарат атазанавир (atazanavir, reyataz), используемый в антиретровирусной терапии, является ингибитором как протеазы ВИЧ, так и фермента УДФГТ. В группе риска по гипербилирубинемии, вызываемой этим препаратом, находятся пациенты с аллелями UGT1A1*28 и *37 (*Gammal et al., 2016*).

Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *UGT1A1-STR*

Аллели (*)	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (**)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для расчётов индекса и вероятности родства (***)
5 (*36)	95	0	0,001
6 (*1, Wild type)	**97**	**0,6822**	**0,682**
7 (*28)	99	0,3178	0,316
8 (*37)	101	0	0,001

(*) Нумерация аллелей согласно числу содержащихся в них тандемных повторов. В скобках приводится альтернативное обозначение аллелей.
(**) популяционные данные для населения России в настоящее время представлены весьма отрывочно; приведены данные из работы *Шаталовой и др., 2006* (популяционная выборка из 118 здоровых женщин).
(***) оценка частот аллелей проведена по данным, суммированным для европеоидного населения США и Европы (729 неродственных человек из 8 популяций, по данным *Gammal et al., 2016*).

Ссылки

- Захарова И.Н., Пыков М.И., Калоева З.В., Катаева Л.А., Шишкина С.В., Бережная И.В., Резниченко Е.В., Молоткова Н.В. (2011) Апостериорная ценность клинических и лабораторных проявлений синдрома Жильбера у детей. – Педиатрическая фармакология, 8 (4), 101-104. ISSN 2500-3089.
- Куропаткина Ю.В., Карабанов А.В., Шулятьев И.С., Тверская С.М., Поляков А.В. (2005) Инсерция в промоторной области гена UGT1 и непереносимость лекарственных препаратов. – Медицинская генетика, 4 (5), 216. Материалы V Съезда Российского общества медицинских генетиков. ISSN:2073-7998.
- Шаталова Е.Г., Логинов В.И., Брага Э.А., Казубская Т.П., Судомоина М.А., Бланчард Р.Л., Фаворова О.О. (2006) Ассоциация полиморфизма генов SULT1A1 и UGT1A1 с риском заболевания раком молочной железы и с его фенотипом у русских женщин. – Молекулярная биология, 40 (2), 263-270. PMID: 16637266.

- Beutler E., Gelbart T., Demina A. (1998) Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (14), 8170-8174. PMID: 9653159.
- Bosma P.J., Chowdhury J.R., Bakker C., Gantla S., de Boer A., Oostra B.A., Lindhout D., Tytgat G.N., Jansen P.L., Oude Elferink R.P., Chowdhury N.R. (1995) The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. – N. Engl. J. Med., 333 (18), 1171-1175. PMID: 7565971.
- Chowdhury J.R., Wolkoff A.W., Chowdhury N.R., Arias I.M. (2001) Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: Scriver C.R.; Beaudet A.L.; Sly W.S.; Valle D. (eds.): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. 2. New York: McGraw-Hill (8th ed.), 2000, pp. 3063-3101. ISBN: 9780079130358.
- Etienne-Grimaldi M.C., Boyer J.C., Thomas F., Quaranta S., Picard N., Loriot M.A., Narjoz C., Poncet D., Gagnieu M.C., Ged C., Broly F., Le Morvan V., Bouquié R., Gaub M.P., Philibert L., Ghiringhelli F., Le Guellec C.; Collective work by Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique (GPCO-Unicancer); French Réseau National de Pharmacogénétique Hospitalière (RNPGx). (2015) UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice. – Fundam. Clin. Pharmacol., 29 (3), 219-237. PMID: 25817555.
- Farrar J.S., Palais R.A., Wittwer C.T. (2011) Snapback primer genotyping of the Gilbert syndrome UGT1A1 (TA)(n) promoter polymorphism by high-resolution melting. – Clin. Chem., 57 (9), 1303-1310. PMID: 21771946.
- Fertrin K.Y., Gonçalves M.S., Saad S.T., Costa F.F. (2002) Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. – Am. J. Med. Genet., 108 (2), 117-119. PMID: 11857560.
- Gammal R.S., Court M.H., Haidar C.E., Iwuchukwu O.F., Gaur A.H., Alvarellos M., Guillemette C., Lennox J.L., Whirl-Carrillo M., Brummel S., Ratain M.J., Klein T.E., Schackman B.R., Caudle K.E., Haas D.W. (2016) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for UGT1A1 and Atazanavir Prescribing. – Clin. Pharmacol. Ther., 99 (4), 363-369. PMID: 26417955.
- Haverfield E.V., McKenzie C.A., Forrester T., Bouzekri N., Harding R., Serjeant G., Walker T., Peto T.E., Ward R., Weatherall D.J. (2005) UGT1A1 variation and gallstone formation in sickle cell disease. – Blood, 105 (3), 968-972. PMID: 15388579.
- Innocenti F., Undevia S.D., Iyer L., Chen P.X., Das S., Kocherginsky M., Karrison T., Janisch L., Ramírez J., Rudin C.M., Vokes E.E., Ratain M.J. (2004) Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. – J. Clin. Oncol., 22 (8), 1382-1388. PMID: 15007088.
- Kaniwa N., Kurose K., Jinno H., Tanaka-Kagawa T., Saito Y., Saeki M., Sawada J., Tohkin M., Hasegawa R. (2005) Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel single nucleotide polymorphism 686C> T (P229L) found in an African-American. – Drug Metab. Dispos., 33 (3), 458-465. PMID: 15572581.
- Lampe J.W., Bigler J., Horner N.K., Potter J.D. (1999) UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1*28 and UGT1A6*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations. – Pharmacogenetics, 9 (3), 341-349. PMID: 10471066.
- Pacheco P.R., Brilhante M.J., Ballart C., Sigalat F., Polena H., Cabral R., Branco C.C., Mota-Vieira L. (2009) UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A7 genetic analysis: repercussion for irinotecan pharmacogenetics in the São Miguel Island Population (Azores, Portugal). – Mol. Diagn. Ther., 13 (4), 261-268. PMID: 19712005.
- PharmGKB: https://www.pharmgkb.org/gene/PA420
- Premawardhena A., Fisher C.A., Liu Y.T., Verma I.C., de Silva S., Arambepola M., Clegg J.B., Weatherall D.J. (2003) The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (UGT1A1): hematologic and evolutionary implications. – Blood Cells Mol. Dis., 31 (1), 98-101. PMID: 12850492.
- Tukey R.H., Strassburg C.P., Mackenzie P.I. (2002) Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. – Mol. Pharmacol., 62 (3), 446-450. PMID: 12181419.
- UGT1A1 Pyro Handbook, Qiagen: https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=971f7672-dd5a-4630-9987-39556ddee548&lang=en
- Whirl-Carrillo M., McDonagh E.M., Hebert J.M., Gong L., Sangkuhl K., Thorn C.F., Altman R.B., Klein T.E. (2012) Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. – Clin. Pharmacol. Ther., 92 (4), 414-417. PMID: 22992668.

Формат комплектации наборов

- Набор на 100 скрининговых реакций с детекцией продуктов ПЦР в неденатурирующих ПАГ. Аллельная «лестница» в состав наборов по этому локусу **не входит**. Вместо неё рекомендуется использовать продукты ПЦР гетерозиготных образцов контрольных ДНК или аллельную «лестницу» на локус *D22S1045*.
- Дополнительный набор для секвенирования 24 (48) образцов, включая набор для очистки соответствующего числа ПЦР-реакций.
- Набор на 100 (400) скрининговых реакций с детекцией продуктов ПЦР на капиллярном электрофорезе (только фрагментный анализ).

Коды продукции

Классификатор	Код продукции	Расшифровка кода	Примечания
ОКПД2 (ОК 034-2014, КПЕС 2008)	20.59.52.190	Реагенты сложные диагностические или лабораторные, не включенные в другие группировки	Дата введения классификатора: 01.02.2014
	20.59.52.199	Реагенты сложные диагностические или лабораторные прочие, не включенные в другие группировки	

Дополнительная информация

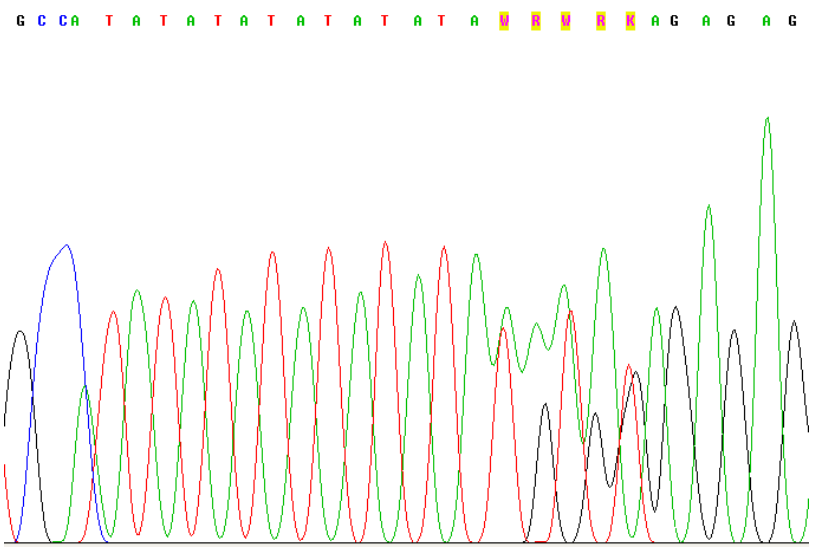
- Наборы *ТАПОТИЛИ* предназначены для исследовательских работ *in vitro* (то есть в пробирке, вне живого организма).
- Наборы не подлежат обязательной сертификации и декларированию соответствия в Системе сертификации ГОСТ Р.
- Наборы *ТАПОТИЛИ* не являются изделием медицинского назначения, не предназначены для использования в целях медицинской диагностики, для диагностических процедур, для профилактики и лечения заболеваний. По этим причинам наборы *ТАПОТИЛИ* не подлежат государственной регистрации на территории РФ (в том числе в Росздравнадзоре) в качестве медицинского изделия.
- Молекулярно-генетические исследования (МГИ) по установлению генотипов отдельных лиц, в том числе по идентификации личности и установлению спорного родства методом анализа полиморфных локусов генома человека не являются медицинской деятельностью: устанавливаются именно биологические факты (генотипы обследуемых лиц).
- Результаты МГИ мы рекомендуем оформлять в виде Заключения специалиста, отчёта о НИР и аналогичных документов, не являющихся медицинскими документами.
- Интерпретация медицинской значимости полученных данных и принятие клинического решения относится к компетенции врача.

- The *Tapotili* Kit is intended for molecular biology applications, including forensic or paternity usage. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Фрагмент нуклеотидной последовательности микросателлита *UGT1A1-STR* для **гетерозиготного** генотипа **6/7**.

Результат секвенирования продукта ПЦР для образца ДНК L68, содержащего фрагменты **разной длины**, 97 и 99 п.н. В правой части хроматограммы отчётливо видно смешение пиков, обусловленное «сдвигом» сиквенса на один повтор (ta).

Структура повторов: A-(TA)$_{6\text{-}7}$-TAA-GT.



Техническое содействие / информация

Благодарим Вас за то, что Вы предпочли нашу продукцию и будем рады продолжить сотрудничество.

Дополнительная информация о других наборах ***Тапотили*** (полная инструкция) доступна по ссылке: https://tapotili.ru/doc/tapotili.pdf.

Актуальная версия непосредственно этого описания доступна здесь: https://tapotili.ru/doc/ugt1a1_str.pdf.

Адресуйте все вопросы, предложения, а также возможные рекламации:

Интернет: https://www.tapotili.ru/

Электронная почта: info@tapotili.ru

Моб. тел.: +7-903-786-4-789.

Ефремов Илья Алексеевич, кандидат биологических наук