

Оригинальная статья

Разработка и валидация таргетного метода секвенирования по Сэнгеру для молекулярной диагностики фенилкетонурии

[Каиржанова А.Д.](#)¹, [Камалова Д.К.](#)², [Ахметова А.Е.](#)³, [Баянова М.Ф.](#)⁴, [Филипенко М.Л.](#)⁵, [Шевцов А.Б.](#)^{6*}

Received: 19.01.2026

Accepted: 15.02.2026

Published: 30.04.2026

Citation: Alma Kairzhanova, Dinara Kamalova, Assel Akhmetova, Mirgul Bayanova, Maxim Filipenko, Alexandr Shevtsov. Razrabotka i validaciya targetnogo metoda sekvenirovaniya po Se'ngeru dlya molekulyarnoj diagnostiki fenilketonurii (Development and validation of a targeted Sanger sequencing for molecular diagnosis of phenylketonuria) [in Russian]. Astana Medical Journal, 2026, 126(2), amj009.

<https://doi.org/10.54500/2790-1203-2026-2-126-amj009>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



¹ Старший научный сотрудник, Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан. E-mail: kairzhanova@biocenter.kz

² Старший научный сотрудник, Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан. E-mail: diwr@mail.ru

³ Старший научный сотрудник, Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан. E-mail: akhmet.assel@gmail.com

⁴ Заведующая отделом клиническо-генетической диагностики, Корпоративный фонд «University Medical Center», Астана, Казахстан. E-mail: mirgul090909@mail.ru

⁵ Заведующий лабораторией фармакогеномики, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Российская Федерация. E-mail: filipenko_1966@inbox.ru

⁶ Заведующий лабораторией прикладной генетики, Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан. E-mail: ncbshevtsov@gmail.com

* Корреспондирующий автор: ncbshevtsov@gmail.com

Резюме

Введение. Фенилкетонурия (ФКУ) — аутосомно-рецессивное нарушение обмена фенилаланина, обусловленное патогенными вариантами гена PAH. Аллельная гетерогенность гена и необходимость дифференциальной диагностики форм гиперфенилаланинемии требуют молекулярного подтверждения. Секвенирование по Сэнгеру сохраняет значение как доступный и надёжный метод верификации вариантов и семейного анализа.

Цель исследования. Разработка и валидация унифицированного протокола ПЦР и секвенирования по Сэнгеру всех кодирующих экзонов PAH с расширенным покрытием экзон-интронных границ.

Материалы и методы. Разработана панель из 31 праймера для амплификации 13 экзонов PAH, включая перекрывающиеся ампликоны для экзона 13. Применены унифицированные условия ПЦР (60 °C). Валидация проведена на 5 образцах ДНК, включая семейное трио. Секвенирование выполнено на Applied Biosystems 3730xl.

Результаты. Разработанная панель праймеров обеспечила воспроизводимую и высокоспецифичную амплификацию всех целевых участков ожидаемого размера. Секвенирование продемонстрировало высокое качество хроматограмм и полное покрытие анализируемых фрагментов, включая перекрывающиеся регионы. В семейном трио у пробанда были выявлены два

патогенных миссенс-варианта гена PАН в состоянии составной гетерозиготности: с.728G>A (p.Arg243Gln) в экзоне 7 и с.1238G>C (p.Arg413Pro) в экзоне 12. Семейный анализ показал, что вариант с.728G>A был унаследован от отца, а с.1238G>C — от матери. Дополнительно в отцовском аллеле была идентифицирована синонимичная замена с.735G>A.

Установленный генотип полностью соответствовал клиническому диагнозу классической ФКУ и подтвердил диагностическую пригодность разработанного подхода.

Выводы. Предложенный протокол является воспроизводимым, доступным и клинически информативным методом молекулярной диагностики ФКУ и может использоваться как самостоятельный инструмент и для подтверждения результатов других подходов.

Ключевые слова: фенилкетонурия, гиперфенилаланинемия, секвенирование экзома, анализ мутаций ДНК.

1. Введение

Фенилкетонурия (ФКУ) представляет собой наследственное аутосомно-рецессивное нарушение обмена фенилаланина, обусловленное недостаточностью фермента фенилаланингидроксилазы (PАН; EC 1.14.16.1). Фенилаланингидроксилаза катализирует превращение фенилаланина в тирозин в присутствии тетрагидробиоптерина (ВН4), молекулярного кислорода и ионов железа [1]. Снижение активности фермента приводит к накоплению фенилаланина и его токсических метаболитов, что лежит в основе развития неврологических, когнитивных и метаболических нарушений, характерных для фенилкетонурии [2].

Клиническая тяжесть заболевания в значительной степени определяется остаточной активностью фермента и уровнем гиперфенилаланинемии. На основании исходной концентрации фенилаланина в крови, выделяя континуум состояний от лёгкой гиперфенилаланинемии (120–600 мкмоль/л) до лёгкой формы фенилкетонурии (600–1200 мкмоль/л) и тяжёлой классической формы (>1200 мкмоль/л) [3].

В большинстве случаев молекулярной основой фенилкетонурии являются патогенные варианты гена PАН, локализованного в области 12q23.2 [4]. Ген PАН включает 13 кодирующих экзонов и характеризуется выраженной аллельной гетерогенностью. Патогенные варианты могут локализоваться в различных функционально значимых участках гена, затрагивая кодирующую последовательность и прилежащие области,

вовлечённые в сплайсинг, что определяет молекулярную неоднородность фенилкетонурии [5].

Несмотря на генетическую неоднородность, ФКУ относится к числу наследственных заболеваний, для которых тяжёлые клинические последствия в значительной степени предотвратимы [6]. Основой лечения остаётся раннее назначение диеты с ограничением фенилаланина, а у части пациентов — применение патогенетической терапии, включая сапроптерин при ВН4-ответных формах [7]. Показано, что именно раннее начало терапии является ключевым фактором профилактики необратимых нарушений со стороны центральной нервной системы и обеспечения благоприятного нейрокогнитивного прогноза [8,9].

Именно поэтому фенилкетонурия стала одним из первых наследственных заболеваний, включённых в национальные программы неонатального скрининга [10]. Первичная диагностика обычно основана на определении уровня фенилаланина в сухих пятнах крови новорождённых [11]. Однако биохимический скрининг не позволяет в полной мере установить молекулярную природу гиперфенилаланинемии и требует последующей подтверждающей диагностики. В клинической практике особенно важно различать классическую PАН-ассоциированную форму фенилкетонурии и более редкие нарушения обмена ВН4, имеющие иной патогенез и требующие отличающихся подходов к ведению пациента [12]. В этой связи молекулярно-генетическое исследование приобретает не только диагностическое, но и клинико-прогностическое

значение, в том числе для оценки потенциальной чувствительности к ВН4 [13,14].

Вместе с тем молекулярный анализ гена PАН осложняется его выраженной аллельной гетерогенностью: на сегодняшний день в базе PАНvdb (версия 2024) зарегистрировано более 1500 патогенных вариантов, распределённых по всем 13 экзонам. Такая вариабельность существенно снижает диагностическую полноту таргетных методов, ориентированных на ограниченный набор частых мутаций, включая аллель-специфическую ПЦР и ПЦР с последующим рестрикционным анализом [15,16].

«Золотым стандартом» молекулярного анализа PАН остаётся секвенирование кодирующих экзонов и прилежащих сплайс-сайтов. На протяжении трёх десятилетий метод Сэнгера был основным инструментом для этих целей [17]. С внедрением массового параллельного секвенирования (NGS) протоколы Сэнгера постепенно вытесняются из рутинной диагностики, однако сохраняют значение для верификации вариантов, семейного сегрегационного анализа и в лабораториях с ограниченным доступом к NGS-платформам [18,19]. Более того, для ряда генов с

умеренным числом экзонов (как PАН) секвенирование по Сэнгеру остаётся экономически эффективным при анализе единичных образцов [20,21].

Существующие опубликованные протоколы амплификации и секвенирования PАН [22,23] различаются по используемым праймерным панелям, условиям ПЦР и охвату экзон-интронных границ. Большинство из них были разработаны до широкого распространения NGS и не всегда обеспечивают оптимальное покрытие дистальных участков экзонов или прилежащих интронных областей, где могут локализоваться патогенные сплайсинг-варианты. Кроме того, в этих протоколах часто используются разные температуры отжига для разных экзонов, что усложняет лабораторную рутину.

Цель настоящего исследования — разработка и экспериментальная валидация унифицированного протокола ПЦР-амплификации и последующего секвенирования по Сэнгеру всех кодирующих экзонов гена PАН с расширенным покрытием экзон-интронных границ, пригодного для молекулярной верификации ФКУ в клинично-диагностических лабораториях.

2. Материал и методы

2.1 Исследуемый материал и выделение ДНК

В исследование были включены 5 образцов геномной ДНК человека, использованных для разработки и апробации протокола амплификации и секвенирования гена PАН. Три образца были получены из цельной периферической крови членов семьи, в которой у ребёнка ранее был фенотипически установлен диагноз фенилкетонурии. Остальные образцы использовались в качестве контрольного материала на этапах оптимизации условий амплификации и секвенирования.

Выделение геномной ДНК проводили из 0,3 мл цельной периферической крови с использованием набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и предварительную оценку чистоты выделенной ДНК выполняли методом спектрофотометрии на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Образцы ДНК хранили при температуре -20°C до дальнейшего использования.

2.2 Дизайн праймеров и *in Silico*-анализ

В качестве референсной последовательности использовали геномную сборку GRCh38

(NC_000012.12) и транскрипт гена PАН NM_000277.2 (NCBI RefSeq). Праймеры проектировали с учётом следующих критериев: длина 18–25 нт, содержание GC 40–60%, температура плавления (T_m) $58\text{--}62^{\circ}\text{C}$, отсутствие 3'-комплементарности и вторичных структур (шпилек, гомо- и гетеродимеров). Расчёт T_m и проверку вторичных структур проводили с использованием программного обеспечения Geneious Prime и Lasergene (DNASTAR, USA).

Специфичность амплификации проверяли *in silico* с помощью инструмента Primer-BLAST (NCBI) при следующих параметрах: база данных — референсная геномная сборка человека GRCh38, максимальное нецелевое связывание — 3 несовпадения на 3'-конце. Для каждого праймера подтверждено отсутствие значимой гомологии с другими участками генома, включая псевдогены.

2.3 ПЦР-амплификация

Амплификацию целевых участков гена PАН проводили на термоциклере Eppendorf Mastercycler® X50 (Eppendorf, Germany). Реакции выполняли в конечном объёме 25 мкл с использованием 2× PCR Master Mix BioMaster HS-qPCR-Спец (Biolabmix, Россия). Каждая реакционная смесь содержала 12,5

мкл 2× мастер-микса, по 1 мкл прямого и обратного праймеров (Концентрация 10 пмол/мкл, Таблица 1),

геномную ДНК в количестве 200 нг и нуклеазо-свободную воду до конечного объема.

Таблица 1 - Характеристика праймеров, использованных для амплификации и секвенирования гена *PAH*

Наименование	Последовательность 5'-3'	Tm в Geneious Prime	Размер ампликонов, п.н.
PAH_45665_F_ex1	TGCTCTTTACCTGCTGTGCT	59,6	890
PAH_45911_F_ex1_seq	CCGGAAGTGCCTAAACCTGT	60	
PAH_46554_R_ex1	TTCCTGTGAAAGCCACCGAG	60,3	
PAH_50207_F_ex2	TGCCTGGAACCTAGTAGTTGC	59,7	515
PAH_50721_R_ex2	GCCTGTTCAGATCCTGTGT	59,7	
PAH_68274_F_ex3	GAACТААCTGCCACCTCC	60	614
PAH_68887_R_ex3	GGTCCCCAACCTATGTCCAC	59,7	
PAH_85743_F_ex4	CTGGAAGCCAGCCACTTG	61	
PAH_86098_R_ex4	TTTTCCCAGCCCTCGTGТАА	59,2	356
PAH_96512_F_ex5	GCACATTGGAATCCACAGCA	59,1	
PAH_97133_R_ex5	ATTCAGGACCGAGGCCTTTT	59,3	622
PAH_107823_F_ex6	CCCGAAAGTGAGAGCAAATCC	59,3	
PAH_108447_R_ex6	GGAAGGCAGAGCACAGTGAA	60,3	625
PAH_110159_F_ex7	AATGTGCTAGGCTCTGTGCT	59,4	
PAH_110835_R_ex7	CTGCCAAGGGAGTTCTGAGT	59,3	677
PAH_111410_F_ex8	ТАAGACCCTGGCTGCTGTG	60	
PAH_111912_R_ex8	CCCCATGCTTGATCTCCGAA	59,8	503
PAH_116253_F_ex9	CCAAGTGAGGGTGGAAAGGAT	59	
PAH_116761_R_ex9	TGGTGGGTTCAAGATACTGCT	59	509
PAH_118783_F_ex10	CCGCCACAATGAGGAAAGA	60,3	
PAH_119377_R_ex10	GGGAGCCAACCACACTTCT	60,2	595
PAH_119424_F_ex11	CTCCTTTCTCCCTGGCTGT	59,3	
PAH_120007_R_ex11	TCTTGACTTGGTGGTTGCGT	60,1	584
PAH_122647_F_ex12	TCTTGAGCCAGGGGACTAA	59,9	
PAH_123243_R_ex12	TGGTAGGAGGTGGAGTGGAА	59,5	597
PAH_123935_F_ex13	GCCTGGGGAGAGACCTGTТА	60,6	
PAH_124874_R_ex13	TGGGGATTAGGTGCAGAGTTT	59	940
PAH_124746_F_ex13-2	AAGCCCATТАААТАGTTACAAGCA	57,5	
PAH_125724_R_ex13-2	GCTGCAATGGACCTTGGTTT	59,3	979
PAH_125615_F_ex13-3	TCTGCCACTGCCAATGATGT	60	
PAH_126630_R_ex13-3	CTCCCTGTGATGCAGCTCA	60	1016

Амплификацию проводили в следующем режиме: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов, включавших денатурацию при 95 °С в течение 20 с, отжиг праймеров при 60 °С в течение 30 с и элонгацию при 72 °С в течение 1 мин 10 с, с последующей финальной элонгацией при 72 °С в течение 5 мин.

Полученные ампликоны анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле, приготовленном на буфере ТАЕ. Для визуализации ДНК использовали этидиум бромид. Электрофоретическое разделение проводили до достижения достаточного разрешения фрагментов, после чего продукты амплификации визуализировали в ультрафиолетовом свете. Размер

ампликонов оценивали по сравнению с молекулярным маркером длины ДНК.

2.4 Очистка ПЦР-продуктов

Перед постановкой реакции секвенирования продукты ПЦР очищали от остаточных праймеров, свободных дНТФ и компонентов реакционной смеси. Очистку ампликонов проводили в соответствии с протоколом, описанным Бердимуратовой и соавт. [24], с последующим использованием очищенных продуктов в реакции циклического секвенирования.

2.5 Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование очищенных ПЦР-продуктов выполняли методом циклического секвенирования с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) согласно инструкции производителя. Реакции секвенирования проводили с использованием соответствующих прямых или обратных праймеров.

Разделение продуктов реакции секвенирования и регистрацию флуоресцентных сигналов осуществляли на автоматическом

капиллярном генетическом анализаторе Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA).

2.6 Анализ последовательностей и интерпретация вариантов

Первичную обработку и анализ полученных хроматограмм проводили в программном обеспечении SeqScape (Applied Biosystems, USA). Для каждого амплифицированного участка оценивали качество сигнала, наличие гетерозиготных позиций, однонуклеотидных замен, а также малых инсерций и делеций. Выявленные последовательностные варианты сопоставляли с референсной последовательностью гена PАН.

Номенклатуру выявленных вариантов указывали в соответствии с рекомендациями Human Genome Variation Society (HGVS). Для интерпретации клинической значимости обнаруженных изменений использовали данные специализированных баз и опубликованных литературных источников, включая ClinVar и PАНvdb.

3. Результаты

3.1 Разработка панели праймеров для секвенирования гена PАН

Для анализа кодирующей последовательности гена PАН и прилежащих интронных участков, включающих канонические сайты сплайсинга, была разработана панель праймеров для амплификации и последующего секвенирования всех 13 экзонов методом Сэнгера. Всего было подобрано 31 праймер (Таблица 1), включая 1 пару праймеров для экзона 1 с дополнительным внутренним праймером для секвенирования, по 1 паре праймеров для экзонов 2–12 и 3 перекрывающиеся пары праймеров для экзона 13. Такая архитектура обеспечивала полное покрытие кодирующей последовательности, экзон-интронных границ и прилежащих фланкирующих участков.

Праймеры для экзонов 2–12 были размещены в интронных областях на расстоянии от 118 до 306 п.н. от начала экзона и от 101 до 318 п.н. от его конца, что обеспечивало стабильное покрытие канонических донорных и акцепторных сайтов сплайсинга, а также прилежащих интронных последовательностей. Размеры ампликонов для данных экзонов варьировали от 356 до 677 п.н., что соответствует оптимальным условиям для двунаправленного секвенирования методом Сэнгера.

Экзон 1 амплифицировался фрагментом длиной 890 п.н.; при этом прямой праймер располагался на расстоянии 503 п.н. от начала экзона, а дополнительный праймер для секвенирования — на расстоянии 256 п.н., что обеспечивало полное перекрытие ампликона и включение в анализ 5'-фланкирующего участка, потенциально содержащего регуляторные элементы. Использование внутреннего праймера позволяло повысить равномерность покрытия и качество чтения по всей длине фрагмента.

Для экзона 13 применяли перекрывающуюся стратегию с использованием 3 ампликонов длиной 940, 979 и 1016 п.н., формирующих непрерывное покрытие протяжённостью 2696 п.н. Такой подход обеспечивал анализ терминальной кодирующей области гена, участка стоп-кодона и прилежащей 3'-нетранслируемой области, включая потенциально функционально значимые регуляторные элементы.

Разработанная панель обеспечивала полное и непрерывное покрытие всех экзонов гена PАН, экзон-интронных границ и ключевых фланкирующих участков, что делает её пригодной для надёжного выявления как экзонных, так и сплайсинг-ассоциированных вариантов в рамках клинико-генетического анализа.

3.2 Оценка эффективности амплификации и секвенирования целевых участков гена PАН

Экспериментальная валидация разработанных праймеров при использовании унифицированных условий амплификации продемонстрировала воспроизводимое получение

всех целевых ампликонов ожидаемой длины на ДНК контрольного образца (Рисунок 1). Во всех реакциях наблюдалась высокая специфичность амплификации, подтверждаемая наличием единичных доминирующих полос без значимых побочных продуктов.

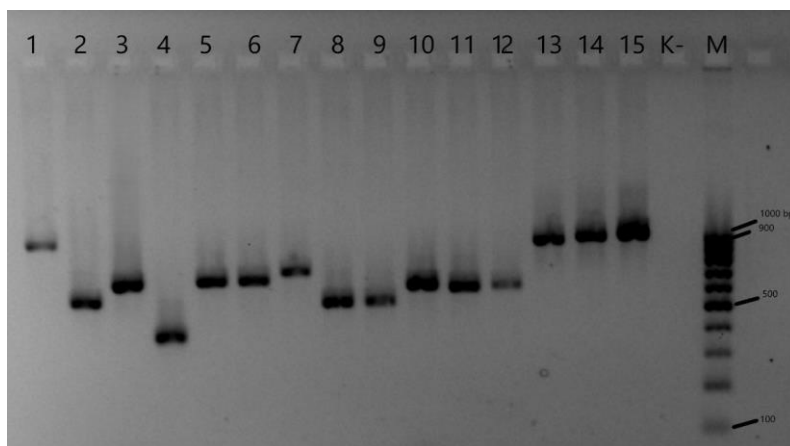


Рисунок 1 - Валидация амплификации целевых участков гена PАН с использованием разработанных праймеров

Секвенирование контрольного образца обеспечило полное покрытие анализируемых участков гена и позволило провести детальный анализ всей целевой последовательности, включая перекрывающиеся регионы, амплифицированные различными праймерными парами. Качество хроматограмм характеризовалось наличием чётких и однозначно интерпретируемых пиков, что подтверждает пригодность разработанной панели праймеров для дальнейшего применения в диагностических и исследовательских задачах.

3.3 Оценка диагностической эффективности

Для оценки диагностической применимости разработанного таргетного метода секвенирования по Сэнгеру были исследованы образцы геномной ДНК, полученные от семьи, включающей ребёнка с клинически установленным диагнозом классической фенилкетонурии и обоих биологических родителей.

Анализ проводили для кодирующих участков и прилежащих экзон-интронных границ гена PАН с использованием разработанной панели праймеров и унифицированных условий амплификации.

В результате анализа последовательностей в исследуемой семье были выявлены три нуклеотидные замены в кодирующей области гена PАН. У ребёнка (Child_25) были обнаружены две миссенс-мутации и одна синонимичная замена. Первая замена была локализована в экзоне 7 и соответствовала варианту с.728G>A, приводящему к аминокислотной замене p.Arg243Gln (R243Q) (Рисунок 2). В этом же экзоне также была выявлена замена с.735G>A, которая не приводит к изменению аминокислоты и, таким образом, представляет собой синонимичный (silent) вариант. Кроме того, при анализе экзона 12 был обнаружен вариант с.1238G>C, вызывающий аминокислотную замену p.Arg413Pro (R413P).

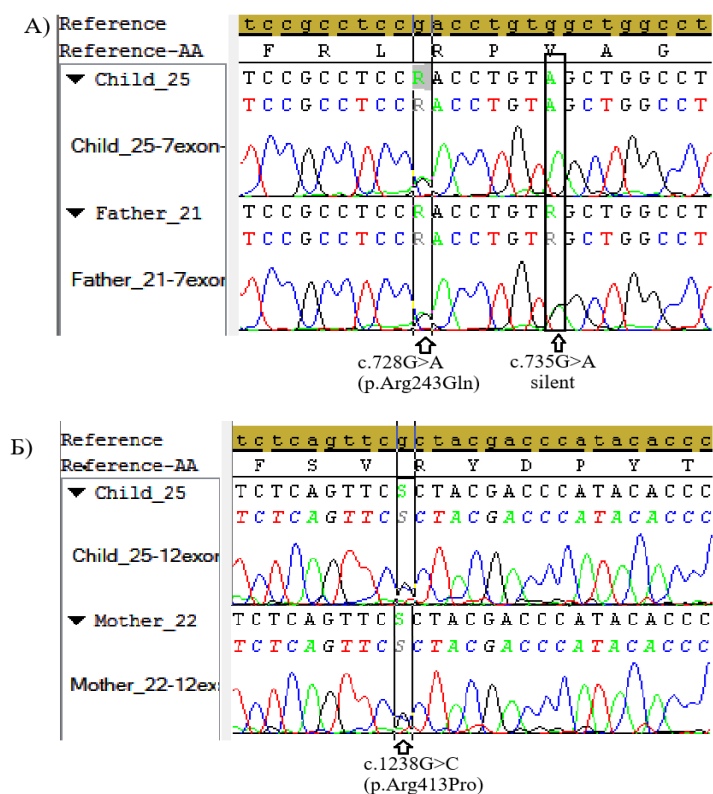


Рисунок 2 - Репрезентативные хроматограммы секвенирования по Сэнгеру вариантов гена PAH, выявленных в исследуемой семье

Проведённый семейный анализ показал, что выявленные варианты были унаследованы от разных родителей. У отца (Father_21) были обнаружены варианты экзона 7 — c.728G>A (p.Arg243Gln) и c.735G>A (синонимичная замена), тогда как у матери (Mother_22) был выявлен вариант экзона 12 — c.1238G>C (p.Arg413Pro). Таким образом, у ребёнка были идентифицированы патогенные миссенс-варианты p.Arg243Gln и p.Arg413Pro, унаследованные соответственно от отца и матери, что соответствует составному гетерозиготному состоянию по гену PAH. Синонимичная замена c.729G>A, выявленная у ребёнка и отца, наследовалась совместно с отцовским аллелем и сама по себе не сопровождалась изменением аминокислотной последовательности белка.

Анализ хроматограмм подтвердил наличие выявленных нуклеотидных замен во всех соответствующих образцах и продемонстрировал получение чётких, интерпретируемых последовательностей, пригодных для надёжной

идентификации вариантов (Рисунок 3). У ребёнка визуализировались гетерозиготные пики в позициях обеих клинически значимых миссенс-замен, тогда как у каждого из родителей определялся только соответствующий семейный вариант, что подтверждало ожидаемый менделевский характер наследования.

В целом, исследование данной семьи показало, что разработанный метод секвенирования по Сэнгеру обеспечивает надёжное выявление как миссенс, так и синонимичных вариантов в гене PAH, а также позволяет корректно проводить сегрегационный анализ в семье. Выявленный у ребёнка генотип полностью соответствовал установленному клиническому диагнозу классической фенилкетонурии, что подтверждает диагностическую пригодность разработанного метода для молекулярной верификации PAH-ассоциированной фенилкетонурии.

4. Обсуждение

Настоящее исследование продемонстрировало практическую применимость разработанного таргетного метода секвенирования по Сэнгеру для молекулярного подтверждения РАН-ассоциированной фенилкетонурии. Предложенный подход обеспечил воспроизводимую амплификацию и последующее секвенирование всех целевых участков гена РАН в унифицированных условиях ПЦР и позволил успешно идентифицировать клинически значимые семейные варианты у трио, включавшего проба с установленным диагнозом и обоих биологических родителей.

В рутинной молекулярной диагностике наследственных заболеваний сам факт успешной амплификации целевого участка не является достаточным критерием аналитической пригодности метода. Диагностическая ценность секвенирования по Сэнгеру определяется не только наличием ПЦР-продукта, но и возможностью получать высококачественные двунаправленные последовательности, уверенно интерпретировать нуклеотидные позиции вблизи экзон-интронных границ и минимизировать потерю клинически значимой информации в участках, прилегающих к краям чтения. Для гена РАН это имеет особое значение, поскольку его экзоны различаются по длине, а прилегающие интронные области характеризуются неоднородным последовательностным контекстом, что может влиять как на эффективность амплификации, так и на качество интерпретации последовательностей.

С методической точки зрения разработанная панель праймеров обладает рядом практических преимуществ по сравнению с ранее опубликованными схемами анализа РАН. В отличие от протоколов, в которых для отдельных экзонов требуется индивидуальная оптимизация условий амплификации, предложенный нами подход использует унифицированный режим ПЦР для всех ампликонов, что существенно упрощает лабораторную реализацию метода и повышает его воспроизводимость [25]. Ряд крупных популяционных исследований, также применяли метод Сэнгера для скрининга вариантов РАН, однако их протоколы часто требовали дифференцированных температурных условий для разных экзонов [26].

Кроме того, предложенный дизайн обеспечивает расширенное покрытие экзон-интронных границ, что выгодно отличает его от ряда

протоколов, ориентированных преимущественно на кодирующие области [27,28]. Разработанный в настоящем исследовании дизайн праймеров предусматривал их размещение на большем удалении от анализируемых кодирующих фрагментов, что позволило обеспечить расширенное покрытие экзон-интронных границ и прилежащих некодирующих последовательностей. Такой подход имеет практическое значение не только для повышения надёжности интерпретации классических экзонных вариантов, но и для потенциального выявления отдельных глубоких интронных патогенных изменений, включая, например, вариант с.1065+241C>A, ассоциированный с образованием псевдоэкзона длиной 81 нуклеотид [29].

Использование разработанного протокола позволило выявить у проба два клинически значимых варианта гена РАН — **c.728G>A (p.Arg243Gln)** и **c.1238G>C (p.Arg413Pro)** — в состоянии **составной гетерозиготности** с чётко прослеживаемой родительской сегрегацией. Оба варианта относятся к **патогенным аллелям**, ассоциированным с фенилаланингидроксилазной недостаточностью, и полностью соответствуют молекулярной основе **классической фенилкетонурии**. С клинико-генетической точки зрения данный результат имеет принципиальное значение, поскольку демонстрирует, что разработанный протокол обеспечивает не только точное выявление патогенных замен в кодирующих участках РАН, но и позволяет корректно устанавливать их аллельное происхождение в семейном контексте, что особенно важно для подтверждения аутосомно-рецессивного характера заболевания. Семейный формат валидации является особенно информативным для оценки клинической применимости диагностического метода в генетике моногенных заболеваний, и подобный подход широко применяется в современных исследованиях [30].

Вариант **c.728G>A (p.Arg243Gln)** относится к числу **хорошо охарактеризованных патогенных аллелей** гена РАН и неоднократно описывался у пациентов с фенилкетонурией, особенно в восточноазиатских популяциях, включая китайскую, где он является наиболее частым вариантом с частотой аллеля 13,8–17,7% [31,32]. По данным крупных когортных исследований, данный вариант

стабильно выявляется в составе как **гомозиготных**, так и **компаунд-гетерозиготных** генотипов у пациентов с клинически выраженной гиперфенилаланиемией, что подтверждает его устойчивую патогенную значимость [33].

В свою очередь, вариант с.1238G>C (p.Arg413Pro) представляет собой хорошо документированный патогенный аллель, локализованный в дистальной части кодирующей последовательности гена PAH. По данным отдельных исследований китайских когорт пациентов с фенилкетонурией, данный вариант может составлять около 4,6% среди выявляемых мутантных аллелей [34].

Таким образом, разработанный таргетный метод секвенирования по Сэнгеру продемонстрировал высокую аналитическую и клинико-диагностическую информативность при анализе гена PAH и подтвердил свою пригодность для молекулярной верификации фенилкетонурии, выявления клинически значимых нуклеотидных замен и проведения семейного сегрегационного анализа. С учётом относительной доступности, воспроизводимости и методической прозрачности данный подход может представлять практический интерес для клинико-диагностических лабораторий, выполняющих анализ отдельных генов при наследственных заболеваниях.

5. Выводы

Предложенный протокол является воспроизводимым, доступным и клинически информативным методом молекулярной диагностики ФКУ и может использоваться как самостоятельный инструмент и для подтверждения результатов других подходов.

Конфликт интересов: Отсутствует.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования

Республики Казахстан в рамках гранта ИРН BR24992881 «Разработка клеточных, геномных и протеомных технологий для диагностики социально значимых заболеваний в Республике Казахстан».

Вклад авторов: Концептуализация - А.Ш.; Методология - А.К., Д.К., А.А., и М. Б.; (оригинальная черновая подготовка) - М.Ф. и А.Ш.; написание (обзор и редактирование) - А.К., Д.К., А.А. и А.Ш. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи и согласились с его содержанием.

Литература

1. Scriver, C. R. (2007). The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Human Mutation*, 28(9), 831–845. <https://doi.org/10.1002/humu.20526>
2. Nulmans, I., Lequeue, S., Desmet, L., Neuckermans, J., & De Kock, J. (2025). Current state of the treatment landscape of phenylketonuria. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 20(1), 281. <https://doi.org/10.1186/s13023-025-03840-y>
3. Gundorova, P., Zinchenko, R. A., Kuznetsova, I. A., Bliznetz, E. A., Stepanova, A. A., & Polyakov, A. V. (2018). Molecular-genetic causes for the high frequency of phenylketonuria in the population from the North Caucasus. *PLOS ONE*, 13(8), e0201489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201489>
4. Abkevich, V., Camp, N. J., Hensel, C. H., Neff, C. D., Russell, D. L., Hughes, D. C., & Cannon-Albright, L. (2003). Predisposition locus for major depression at chromosome 12q22–12q23.2. *American Journal of Human Genetics*, 73(6), 1271–1281. <https://doi.org/10.1086/379978>
5. Köseoğlu, S. Z. A., & Çelikel, S. (2020). The current information in nutrition therapy of phenylketonuria. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 18, 755–761. <https://doi.org/10.31590/EJOSAT.693556>
6. Brown, C. S., & Lichter-Konecki, U. (2016). Phenylketonuria (PKU): A problem solved? *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 6, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.12.004>
7. Bélanger-Quintana, A., Burlina, A., Harding, C. O., & Muntau, A. C. (2011). Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, S19–S25. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.009>
8. Burke, W., Tarini, B., Press, N. A., & Evans, J. P. (2011). Genetic screening. *Epidemiologic Reviews*, 33(1), 148–164. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxr008>
9. Ramoser, G., Cafferri, F., Radlinger, B., Brunner-Krainz, M., Herbst, S., Huemer, M., & Austrian IMD Registry Group. (2022). 100 years of inherited metabolic disorders in Austria — A national registry of minimal birth prevalence,

diagnosis, and clinical outcome of inborn errors of metabolism in Austria between 1921 and 2021. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 45(2), 144–156. <https://doi.org/10.1002/jimd.12442>

10. Salama, N., Gamal, R., Zaki, O., Khalil, A., Obada, M., & El Gedawy, G. (2023). Determination of neopterin and biopterin in dried blood spot by tandem mass spectrometry in classic and atypical hyperphenylalaninemia. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 90(1), 904–913. <https://doi.org/10.21608/EJHM.2023.279962>

11. Lo Bianco, M., Leonardi, R., Migliore, A., Moliteo, E., Sciacca, M., Rinella, S., & Polizzi, A. (2025). Sapropterin dihydrochloride responsiveness in phenylketonuria: A case series exploring gaps in comprehensive patient monitoring. *Nutrients*, 17(17), 2892. <https://doi.org/10.3390/nu17172892>

12. Hillert, A., Anikster, Y., Belanger-Quintana, A., Burlina, A., Burton, B. K., Carducci, C., & Blau, N. (2020). The genetic landscape and epidemiology of phenylketonuria. *American Journal of Human Genetics*, 107(2), 234–250. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.006>

13. Zeng, B., Lu, Q., Chen, S., Guan, H., Xu, X., Zou, Y., & Yang, B. (2023). Screening and mutation analysis of phenylalanine hydroxylase deficiency in newborns from Jiangxi province. *Frontiers in Genetics*, 14, 1049816. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1049816>

14. Costa, R. D., Galera, B. B., Rezende, B. C., Venâncio, A. C., & Galera, M. F. (2020). Identification of mutations in the PAH gene in PKU patients in the state of Mato Grosso. *Revista Paulista de Pediatria*, 38, e2018351. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2020/38/2018351>

15. Tolve, M., Artiola, C., Pasquali, A., Giovanniello, T., D'Amici, S., Angelon, A., & Carducci, C. (2018). Molecular analysis of PKU-associated PAH mutations. *Methods and Protocols*, 1(3), 30. <https://doi.org/10.3390/mps1030030>

16. Bernabeu, P., Lynott, D., & Connell, L. (2021). Preregistration: The interplay between linguistic and embodied systems in conceptual processing. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2017-313929>

17. Shen, G., Li, W., Zhang, Y., & Chen, L. (2024). Next-generation sequencing based newborn screening and comparative analysis with MS/MS. *BMC Pediatrics*, 24(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s12887-024-04718-x>

18. Liu, N., Kong, X. D., Zhao, D. H., Wu, Q. H., Li, X. L., Guo, H. F., & Shi, H. R. (2015). Prenatal diagnosis of Chinese families with phenylketonuria. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 14615–14628. <https://doi.org/10.4238/2015.November.18.25>

19. Jalali, H., Zamanfar, D., Amirzadegan, M., Ghadami, F., Mahdavi, M., & Mahdavi, M. R. (2024). Mutation analysis of PAH gene in phenylketonuria patients from the North of Iran: Identification of three novel pathogenic variants. *International Journal of Preventive Medicine*, 15, 22. https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm_50_23

20. Wang, Q., Duan, J., Zhao, X., & Qi, Z. (2025). The incidence rate and gene mutation characteristics of hyperphenylalaninemia in Yunnan Province, Southwest China. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 20(1), 606. <https://doi.org/10.1186/s13023-025-04114-3>

21. Lee, Y. W., Lee, D. H., Kim, N. D., Lee, S. T., Ahn, J. Y., Choi, T. Y., Lee, Y. K., Kim, S. H., Kim, J. W., & Ki, C. S. (2008). Mutation analysis of PAH gene and characterization of a recurrent deletion mutation in Korean patients with phenylketonuria. *Experimental & Molecular Medicine*, 40(5), 533–540. <https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.5.533>

22. Berdimuratova, K. T., Amirgazin, A. O., Kuibagarov, M. A., Lutsay, V. B., Mukanov, K. K., & Shevtsov, A. B. (2020). Optimization of PCR purification using silica-coated magnetic beads. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 1. <https://www.biotechlink.org/index.php/journal/article/view/20>

23. Bercovich, D., Elimelech, A., Zlotogora, J., Korem, S., Yardeni, T., Gal, N., & Anikster, Y. (2008). Genotype–phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. *Journal of Human Genetics*, 53(5), 407–418. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0264-4>

24. Liu, N., Huang, Q., Li, Q., Zhao, D., Li, X., Cui, L., & Kong, X. (2017). Spectrum of PAH gene variants among a population of Han Chinese patients with phenylketonuria from northern China. *BMC Medical Genetics*, 18(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0516-2>

25. Vieira Neto, E., Laranjeira, F., Quelhas, D., Ribeiro, I., Seabra, A., Mineiro, N., & Ribeiro, M. G. (2018). Mutation analysis of the PAH gene in phenylketonuria patients from Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 6(4), 575–591. <https://doi.org/10.1002/mgg3.408>

26. Shirzadeh, T., Saeidian, A. H., Bagherian, H., Salehpour, S., Setoodeh, A., Alaei, M. R., ... & Sharifi, F. V. (2018). Molecular genetics of a cohort of 635 cases of phenylketonuria in a consanguineous population. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(6), 1159–1167. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0228-6>

27. Jin, X., Yan, Y., Zhang, C., Tai, Y., An, L., Yu, X., & Ma, X. (2022). Identification of novel deep intronic PAH gene variants in patients diagnosed with phenylketonuria. *Human Mutation*, 43(1), 56–66. <https://doi.org/10.1002/humu.24292>

28. Rahimzadeh, A., Khosravi, T., Motallebi, F., Al Sudani, Z. M., Vaghefi, F., Kowsari, A., & Oladnabi, M. (2024). A rare combination of compound heterozygous mutations in the PAH gene in three unrelated consanguineous Iranian families with classical phenylketonuria. *Advanced Biomedical Research*, 13, 64. https://doi.org/10.4103/abr.abr_471_23

29. Wang, X., Wang, Y., Ma, D., Zhang, Z., Li, Y., Yang, P., & Jiang, T. (2021). Neonatal screening and genotype–phenotype correlation of hyperphenylalaninemia in the Chinese population. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01846-w>

Фенилкетонурияны молекулярлы диагностикалауға арналған Сэнгер бойынша секвенирлеудің мақсатты әдісін әзірлеу және валидациялау

[Каиржанова А.Д.](#)¹, [Камалова Д.К.](#)², [Ахметова А.Е.](#)³, [Баянова М.Ф.](#)⁴,
[Филипенко М.Л.](#)⁵, [Шевцов А.Б.](#)⁶

¹ Аға ғылыми қызметкер, Ұлттық биотехнология орталығы, Астана, Қазақстан. E-mail: kairzhanova@biocenter.kz

² Аға ғылыми қызметкер, Ұлттық биотехнология орталығы, Астана, Қазақстан. E-mail: diwr@mail.ru

³ Аға ғылыми қызметкер, Ұлттық биотехнология орталығы, Астана, Қазақстан. E-mail: akhmet.assel@gmail.com

⁴ Клиника-генетикалық диагностика бөлімінің меңгерушісі, «University Medical Center» Корпоративтік қоры, Астана, Қазақстан. E-mail: mirgul090909@mail.ru

⁵ Фармакогеномика зертханасының меңгерушісі, Химиялық биология және іргелі медицина институты, Новосибирск, Ресей Федерациясы. E-mail: filipenko_1966@inbox.ru

⁶ Қолданбалы генетика зертханасының меңгерушісі, Ұлттық биотехнология орталығы, Астана, Қазақстан. E-mail: ncbshevtsov@gmail.com

Түйіндеме

Кіріспе. Фенилкетонурия (ФКУ) - PAH генінің патогендік нұсқаларына байланысты фенилаланин алмасуының аутосомды-рецессивті бұзылуы. Геннің аллельдік гетерогенділігі, сондай-ақ гиперфенилаланинемияның әртүрлі формаларын ажырата диагностикалау қажеттілігі молекулалық деңгейде растауды талап етеді. Осы тұрғыдан алғанда, Сэнгер әдісі бойынша секвенирлеу генетикалық варианттарды дәл анықтауда, сондай-ақ отбасылық талдау жүргізуде қолжетімді әрі сенімді әдіс ретінде өз маңызын сақтап келеді.

Зерттеудің мақсаты: PAH генінің барлық кодтаушы экзондарын экзон-интрон шекараларының кеңейтілген жабындысымен қамтитын ПТР және Сэнгер бойынша секвенирлеудің бірыңғайланған хаттамасын әзірлеу және валидациялау.

Материалдар мен әдістер. Зерттеу барысында PAH генінің 13 экзонын амплификациялауға арналған 31 праймерден тұратын арнайы панель әзірленді. Аталған панель құрамына 13-экзонды толық қамту үшін қабаттасатын ампликондар енгізілді. ПТР реакциясы үшін 60 °C температурада бірыңғайланған жағдайлар қолданылды. Әзірленген әдістеменің тиімділігі 5 ДНҚ үлгісінде, оның ішінде бір отбасылық триоға жататын үлгілерде тексерілді. Секвенирлеу жұмыстары Applied Biosystems 3730xl платформасында жүргізілді.

Нәтижесі. Зерттеу нәтижесінде әзірленген праймерлер панелі барлық нысаналы аймақтардың күтілетін мөлшерде жоғары спецификалық әрі қайталанымды амплификациясын қамтамасыз ететіні анықталды. Секвенирлеу барысында алынған хроматограммалар жоғары сапамен сипатталып, талданған фрагменттердің толық қамтылғанын, соның ішінде қабаттасатын аймақтардың да сенімді түрде оқылғанын көрсетті. Отбасылық триоға жүргізілген талдау нәтижесінде пробандта PAH генінің екі патогенді миссенс-варианты күрделі гетерозиготалық күйде анықталды: с.728G>A (p.Arg243Gln) - 7-экзонда және с.1238G>C (p.Arg413Pro) - 12-экзонда. Генеалогиялық талдау аталған варианттардың бірін әкесінен, екіншісін анасынан тұқым қуалағанын көрсетті. Сонымен қатар, әкелік аллельде с.735G>A синонимді ауыстыруы анықталды. Анықталған генотип пациенттің клиникалық тұрғыдан қойылған классикалық ФКУ диагнозымен толық сәйкес келіп, ұсынылған әдістің диагностикалық құндылығын дәлелдеді.

Қорытынды. Осылайша, ұсынылып отырған хаттама фенилкетонурияны молекулалық-генетикалық диагностикалауда жоғары қайталанымдылығымен, қолжетімділігімен және клиникалық ақпараттылығымен ерекшеленеді. Бұл әдіс дербес диагностикалық құрал ретінде де, сондай-ақ басқа зерттеу тәсілдерімен алынған нәтижелерді растау мақсатында да тиімді қолданылуы мүмкін.

Түйін сөздер: фенилкетонурия, гиперфенилаланинемия, экзомды секвенирлеу, ДНҚ мутацияларын талдау.

Development and validation of a targeted Sanger sequencing for molecular diagnosis of phenylketonuria

[Alma Kairzhanova](#)¹, [Dinara Kamalova](#)², [Assel Akhmetova](#)³, [Mirgul Bayanova](#)⁴,
[Maxim Filipenko](#)⁵, [Alexandr Shevtsov](#)⁶

¹Senior Researcher, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan. E-mail: kairzhanova@biocenter.kz

²Senior Researcher, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan. E-mail: diwr@mail.ru

³Senior Researcher, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan. E-mail: akhmet.assel@gmail.com

⁴Head of Clinical Genetic Diagnostics Department, Corporate Fund «University Medical Center», Astana, Kazakhstan. E-mail: mirgul0909@mail.ru

⁵Head of Pharmacogenomics Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation. E-mail: filipenko_1966@inbox.ru

⁶Head of the Laboratory of Applied Genetics, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan. E-mail: nbshevtsov@gmail.com

Abstract

Introduction. Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disorder of phenylalanine metabolism caused by pathogenic variants of the PAH gene. Allelic heterogeneity of the gene and the need for differential diagnosis of forms of hyperphenylalaninemia require molecular confirmation. Sanger sequencing remains valuable as an accessible and reliable method for variant verification and family analysis.

The objective of the study was to develop and validate a unified protocol for PCR and Sanger sequencing of all coding exons of PAH with extended coverage of exon - intron boundaries.

Materials and methods. A panel of 31 primers was developed to amplify 13 PAH exons, including overlapping amplicons for exon 13. Standardized PCR conditions (60 °C) were used. Validation was performed on five DNA samples, including a family trio. Sequencing was performed on an Applied Biosystems 3730xl.

Results. The developed primer panel ensured reproducible and highly specific amplification of all target regions of the expected size. Sequencing demonstrated high-quality chromatograms and complete coverage of the analyzed fragments, including overlapping regions. In the family trio, two pathogenic missense variants of the PAH gene in a state of compound heterozygosity were identified in the proband: c.728G>A (p.Arg243Gln) in exon 7 and c.1238G>C (p.Arg413Pro) in exon 12. Family analysis showed that the c.728G>A variant was paternally inherited, and c.1238G>C was maternally inherited. Additionally, a synonymous substitution c.735G>A was identified in the paternal allele. The established genotype fully corresponded to the clinical diagnosis of classical PKU and confirmed the diagnostic suitability of the developed approach.

Conclusions. The proposed protocol is a reproducible, accessible and clinically informative method for molecular diagnostics of PKU and can be used both as a standalone tool and for validation of results obtained by other approaches.

Keywords: phenylketonuria, hyperphenylalaninemia, exome sequencing, DNA mutation analysis.