

Wykrywanie wybranych mutacji w genie CFTR w pojedynczych komórkach celem zastosowania w diagnostyce preimplantacyjnej mukowiscydozy

Detection of selected mutations in the CFTR gene in single cells for the use in preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis

Bielawska Katarzyna¹, Liss Joanna², Nocoń Katarzyna¹, Łukaszuk Krzysztof^{1,2}

¹ Klinika Endokrynologii Ginekologicznej i Leczenia Niepłodności, Katedra Perinatologii Akademii Medycznej w Gdańsku,

² Klinika Leczenia Niepłodności INVICTA, Gdańsk

Streszczenie

Mukowiscydoza jest jedną z najczęściej występujących chorób dziedziczonych w sposób autosomalny recesywny. Średnia wieku przeżycia pacjentów wynosi dziś około 30 lat. Ze względu na duże znaczenie społeczne mukowiscydozy przykłada się ogromną wagę do opracowywania coraz czulszych i skuteczniejszych metod diagnozujących defekty w genie CFTR, odpowiedzialnym za mukowiscydozę. Zastosowanie tych metod w diagnostyce preimplantacyjnej zapobiegłoby chorobie, a także nosicielstwu.

Cel: Celem pracy była konstrukcja testu diagnostycznego dla pięciu mutacji genu CFTR, najczęściej występujących w populacji polskiej, który można zastosować do badania pojedynczych komórek podczas diagnostyki preimplantacyjnej.

Materiał i metody: Materiałem wykorzystanym w badaniach było 60 pojedynczych komórek – blastomerów. Kontrole pozytywne mutacji: *delf508*, *R117H*, *G542X*, *R553X* i *dele2,3* genu CFTR uzyskano z krwi obwodowej pacjentów chorych na mukowiscydozę. Wstępnie wykonywano reakcję Nested Multiplex PCR. Jej produkty posłużyły jako matryca DNA do kolejnej reakcji – ASA (allele-specific amplification) PCR. Celem weryfikacji zastosowano metodę SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

Wyniki: Skonstruowano test diagnostyczny na obecność mutacji *delf508*, *R117H*, *G542X*, *R553X* i *dele2,3* (u homozygot). W wyniku przeprowadzenia analizy ASA PCR na obecność mutacji w genie CFTR w grupie 60 blastomerów wykryto mutacje *delf508* (3 komórki-5%), *G542X* (2 komórki-3,33%) i *R553X* (1 komórka-1,67%). Analiza SSCP dla mutacji *delf508*, *R117H*, *G542X* i *R553X* potwierdziła wyniki reakcji ASA PCR.

Wnioski: Skonstruowany test diagnostyczny dla mutacji *delf508*, *G542X*, *R553X*, *R117H* i *dele2,3* można zastosować do badania pojedynczych komórek podczas diagnostyki preimplantacyjnej.

Słowa kluczowe: białko CFTR / mukowiscydoza / diagnostyka przedimplantacyjna /

Adres do korespondencji:

Katarzyna Bielawska
Klinika Endokrynologii Ginekologicznej i Leczenia Niepłodności,
Katedra Perinatologii Akademii Medycznej w Gdańsku
80-402 Gdańsk, ul. Kliniczna 1a
e-mail: katarzynanocon@amg.gda.pl

Otrzymano: 15.03.2008

Zaakceptowano do druku: 27.03.2009

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common autosomal recessive diseases. The median life expectancy is currently about 30 years. Because of a considerable social meaning of CF, it is very important to create more specific and efficient methods diagnosing defects in the gene CFTR that are responsible for CF. The use of these methods in preimplantation diagnosis could prevent the disease and also the carrier state.

Objectives: *The aim of this study was to construct a diagnostic test for five CFTR gene mutations, the most frequent in Polish population, which can be used to analyze single cells while preimplantation genetic diagnosis.*

Material: *The material used in research were 60 single cells – blastomers. The positive controls of the CFTR gene mutations: delF508, R117H, G542X, R553X, dele2,3 were obtained from blood of patients with CF. At first Nested Multiplex PCR reaction was performed. Its products were used as DNA template for the next reaction - ASA (allele-specific amplification) PCR. SSCP method (Single Strand Conformation Polymorphism) was used as a verification method.*

Results: *The diagnostic test for the presence of the mutations: delF508, R117H, G542X, R553X and dele2,3 (when homozygosity) was constructed. Mutations: delF508 (3 cells – 5%), G542X (2 cells – 3,33%) and R553X (1 cell – 1,67%) were detected as a result of performing ASA PCR analysis for the presence of the CFTR gene mutations in 60 blastomers. The SSCP analysis for the mutations delF508, R117H, G542X, R553X confirmed the results of ASA PCR analysis.*

Conclusions: *The constructed diagnostic test for the mutations delF508, G542X, R553X, R117H and dele2,3 can be used to analyze single cells during preimplantation genetic diagnosis.*

Key words: **dCFTR protein / Cystic Fibrosis / Preimplantation Genetic Diagnosis /**

Wstęp

Mukowiscydoza (*Cystic Fibrosis* – CF) jest najczęstszą monogenową chorobą genetyczną, dziedziczną w sposób autosomalny recesywny. Po raz pierwszy została rozpoznana w latach trzydziestych XX wieku. Jej przyczyną są mutacje w obrębie genu CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), zlokalizowanego w chromosomie 7q22-31 i składającego się z 27 eksonów [1, 2, 3].

Gen ten koduje białko CFTR, niezbędne do transportu jonów chlorkowych przez błony komórek nabłonkowych gruczołów śluzowych [4, 5]. Wraz z rozwojem technik diagnostycznych oraz sklonowaniem w 1989 roku genu CFTR [1, 2] wzrosła częstość rozpoznawania choroby na poziomie genotypu. Do dzisiaj udało się odnotować ok. 1400 mutacji i 200 polimorfizmów genu CFTR [6]. Liczba ich identyfikacji stale rośnie, przedstawiając tym samym złożony obraz choroby. Znaczna część defektów w genie CFTR to mutacje punktowe. Większość opisanych mutacji, oprócz mutacji delF508, to defekty występujące sporadycznie, a częstość ich występowania nie przekracza 2%. Wyjątek stanowią tu mutacje charakterystyczne dla danych populacji i grup etnicznych [7].

Ze względu na znaczenie społeczne mukowiscydozy przykłada się dużą wagę do opracowywania coraz czulszych i skuteczniejszych metod diagnozujących defekty w genie CFTR. Jedynym pewnym potwierdzeniem klinicznego rozpoznania mukowiscydozy jest identyfikacja mutacji na obu allelach genu CFTR. Ponadto badaniom poddawani są wszyscy członkowie rodziny chorego. Badania te mają na celu analizę sposobu dziedziczenia wadliwego genu, a całą rodzinę określa się mianem rodziny wysokiego ryzyka genetycznego [5]. Dodatkowo członkom takich rodzin oferuje się pomoc w planowaniu potomstwa. Niekiedy zdarza się, że małżeństwo, które posiada już dziecko ze zdiagnozowaną mukowiscydozą, czy też straciło dziecko w wyniku choroby, wręcz uzależnia planowanie kolejnej ciąży od możliwości przeprowadzenia badania prenatalnego bądź preimplantacyjnego.

Badania prenatalne w kierunku mukowiscydozy są przeprowadzane w I oraz II trymestrze ciąży [8]. W analizie molekularnej używa się DNA pochodzącego z komórek trofoblastu lub amniocytów. Badanie to następcza jednak wiele wątpliwości natury etycznej w przypadku wykrycia mutacji na obu allelach genu CFTR, a w konsekwencji trudnej decyzji usunięcia ciąży. Alternatywą dla tego problemu jest diagnostyka preimplantacyjna (*Preimplantation Genetic Diagnosis* – PGD) w rodzinach ryzyka. Badanie to jest połączeniem zapłodnienia *in vitro* i diagnostyki molekularnej [9]. Pozwala ono na wykrycie chorych zarodków i podanie do macicy tylko zdrowego zarodka. Pojedyncze komórki zarodka – blastomery pobiera się, gdy znajduje się on w stadium 6 lub 8 komórek. Na tym etapie biopsja nie zaburza dalszego prawidłowego rozwoju zarodka. Całą diagnostykę należy przeprowadzić w ciągu 24-48 godzin. Polega ona na zastosowaniu technik PCR, które pozwalają na amplifikację wybranych fragmentów genu CFTR i identyfikację badanych mutacji.

Cel pracy

Celem pracy była konstrukcja testu diagnostycznego dla pięciu mutacji genu CFTR (delF508, G542X, R553X, R117H, dele2,3), który można zastosować do badania pojedynczych komórek podczas diagnostyki preimplantacyjnej oraz przebadanie pojedynczych komórek – blastomerów pobranych z zarodków pacjentek poddanych procedurze zapłodnienia pozaustrojowego.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło DNA z 60 pojedynczych komórek – blastomerów, pobranych z nieprawidłowych, nierozwijających się zarodków. Komórki otrzymano za zgodą pacjentów, poddanych procedurze zapłodnienia pozaustrojowego w Klinice Leczenia Niepłodności INVICTA w Gdańsku. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badania.

Wykrywanie wybranych mutacji w genie CFTR w pojedynczych komórkach...

Kontrole pozytywne mutacji: delF508, R117H, G542X, R553X i dele2,3 genu CFTR uzyskano z krwi obwodowej pacjentów leczonych w Poradni Mukowiscydozy przy Szpitalu Dziecięcym w Gdańsku Oliwie.

Primery wykorzystane w niniejszej pracy zaprojektowano przy pomocy programu Vector NTI Suite 6.0 na podstawie sekwencji nukleotydowej ludzkiego genu CFTR. Sekwencja ta została uzyskana z ogólnodostępnej bazy danych GenBank, w której ma przypisany numer NT007933. Primery zostały zaprojektowane zgodnie z ogólnie obowiązującymi zasadami używanymi przy ich konstrukcji oraz z uwzględnieniem specyfiki metod PCR, dla których zostały zaprojektowane. Długość primerów nie przekracza 23nt, a wszystkie mają zbliżoną temperaturę przyłączania (około 40°C), co jest bardzo istotne przy zastosowaniu metody amplifikacji Multiplex PCR. W celu uzyskania bardziej wiernego produktu zastosowano Nested PCR, gdzie w pierwszym etapie stosuje się primery zewnętrzne, a produkt tej reakcji służy jako matryca do następnych reakcji z użyciem primerów wewnętrznych. Sekwencje primerów przedstawiono w tabeli I.

Pojedyncze komórki – blastomery zostały przygotowane przez pracowników Kliniki INVICTA (zawieszono w roztworze do lizy proteinaza K 850µg/ml, SDS 5µg/ml). Na powierzchnię nakładano olej mineralny i zamrażano w temp. -20°C. Tak przygotowane komórki przekazywane były do Kliniki Endokrynologii Ginekologicznej i Leczenia Niepłodności AMG, gdzie przeprowadzono lizę w następujących warunkach: 37°C - 60min., 99°C - 15min. Następnie do komórek poddanych lizie dodawano mieszaninę reakcyjną Nested Multiplex PCR. Całkowita objętość mieszaniny wynosiła 25µl, w jej skład wchodziło: 100µg wyizolowanego DNA, cztery pary primerów nested po 20 pmoli każdy, 0,2mM dNTPs (Symbios), 2 U DyNAzyme II DNA Polymerase (Finnzymes), 2,5µl buforu do PCR (Finnzymes) i 9µl H₂O. Amplifikację DNA wykonywano w termocyklerze TRIO-Thermoblock firmy Biometra w następujących warunkach: denaturacja wstępna – 300sek. w 95°C; 30 cykli amplifikacji: 50sek. w 94°C, 60sek. w 48°C, 60sek. w 72°C oraz wydłużanie końcowe – 300sek. w 72°C. Wyniki reakcji Nested Multiplex PCR sprawdzano wykonując elektroforezę w 2% żelu agarozowym.

Produkty powyższej reakcji posłużyły jako matryca do kolejnej – ASA PCR. W zależności od badanej mutacji zastosowano odpowiednie zestawy primerów. (Tabela II).

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło: 0,5ng/1ng matrycy DNA, trzy primery (zależnie od badanej mutacji) po 20 pmoli każdy, 0,2mM dNTPs, 1 U polimerazy (Finnzymes), 2,5µl buforu do PCR i 15,5µl H₂O.

Warunki prowadzenia reakcji: denaturacja wstępna – 300 sek. w 95°C, 32 cykle amplifikacji: 50 sek. w 94°C, 45 sek. w 49°C, 60 sek. w 72°C oraz wydłużanie końcowe – 300 sek. w 72°C. Wyniki reakcji ASA PCR sprawdzano przeprowadzając rozdział elektroforetyczny w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących, pod napięciem 500 V przez 40 minut w zestawie do elektroforezy płytowej pionowym (Medium, Kucharczyk). Aparat do efektywnej analizy zróżnicowania genetycznego (DNA Pointer System, Kucharczyk) ustawiono na 17°C. Barwienie żelu poliakrylamidowego przeprowadzono metodą srebrową.

Celem weryfikacji metody ASA PCR zastosowano metodę SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) - polimorfizm konformacyjny jednoniciowych fragmentów DNA. Przeprowadzając reakcję SSCP posłużono się produktami reakcji Nested Multiplex PCR jako matrycą DNA. Podczas amplifikacji użyto tylko primerów okalających, używanych podczas reakcji ASA PCR, dzięki czemu pozyskiwano fragmenty jednakowej długości. (Tabela III). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło: 0,075µg matrycy DNA, dwa primery (zależnie od badanej mutacji) po 20pmoli każdy, 0,2mM dNTPs, 1 U polimerazy (Finnzymes), 2,5µl buforu do PCR i 16,5µl H₂O. Warunki prowadzenia reakcji: denaturacja wstępna - 300 sek. w 95°C, 28 cykli amplifikacji: 50 sek. w 94°C, 30 sek. w 49°C, 60 sek. w 72°C oraz wydłużanie końcowe – 300 sek. w 72°C. Wyniki reakcji sprawdzano przeprowadzając rozdział elektroforetyczny w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących, pod napięciem 550V przez 1 godzinę. Aparat do efektywnej analizy zróżnicowania genetycznego ustawiono na 17°C. Barwienie żelu przeprowadzono metodą srebrową.

Wyniki

Przeprowadzone w ramach pracy badania pozwoliły skonstruować test diagnostyczny na obecność mutacji delF508, R117H, G542X, R553X i dele2,3 (u homozygot). Skonstruowany test można modyfikować w zależności od potrzeb; poprzez odejmowanie bądź dodawanie pary primerów zaprojektowanych specyficznym do wybranych mutacji CFTR. Efektem przeprowadzenia analizy ASA PCR na obecność mutacji w genie CFTR w grupie 60 pojedynczych komórek – blastomerów było wykrycie mutacji delF508 (3 komórki – 5%), G542X (2 komórki – 3,33%) i R553X (1 komórka – 1,67%).

Fotografia 1 przedstawia przykładowe zdjęcie żelu poliakrylamidowego po wykonaniu analizy ASA PCR pod kątem mutacji delF508 dla 13 blastomerów. Analiza SSCP dla mutacji delF508, R117H, G542X i R553X potwierdziła wyniki reakcji ASA PCR. Ze względu na bliskość mutacji G542X oraz R553X (dzieli je odległość 32 nukleotydów) użyto dla nich tej samej pary primerów, a obie mutacje były poszukiwane jednocześnie. Biorąc pod uwagę specyfikę mutacji dele2,3 nie była ona weryfikowana analizą SSCP.

Fotografia 2 przedstawia przykładowe zdjęcie żelu poliakrylamidowego po analizie SSCP pod kątem mutacji G542X i R553X dla 13 blastomerów. Częstość występowania poszczególnych mutacji w genie CFTR w przebadanych blastomerach obrazuje rycina 1.

Dyskusja

Mukowiscydoza jest pierwszą chorobą monogenową dziedziczną autosomalnie, w przypadku której zastosowano diagnostykę preimplantacyjną [10]. Udoskonalenie badań na niewielkiej ilości materiału genetycznego, jaki jest w pojedynczej komórce możliwe było dzięki wprowadzeniu reakcji Nested PCR [11]. Stosowana jest ona do syntezy bardziej wiernego produktu i uzyskania wystarczającej ilości DNA do dalszych badań. W niniejszej pracy podczas ustalania warunków reakcji Nested PCR, w której równocześnie stosowano cztery primery (Multiplex PCR), w pierwszej kolejności kierowano się temperaturą przyłączania primerów.

Tabela I. Syntetyczne primery.

Nr	Nazwa	Sekwencja	Temperatura przyłączenia	Długość produktu	Zastosowanie	Źródło
1	nest delF508 F	CTAATGGTGATTATGGGAG	41,6	276 nt	Nested/ Multiplex PCR	Vector NTI Suite 6.0
2	nest delF508 R	TAGACTAACCGATTGAATATG	41,7		Nested/ Multiplex PCR	Vector NTI Suite 6.0
3	nest R117H F	TGTTTTCCCTTTT	40,3	209 nt	Nested/ Multiplex PCR	Vector NTI Suite 6.0
4	nest R117H R	GCTATTCTCATCTGCATTC	41,6		Nested/ Multiplex PCR	Vector NTI Suite 6.0
5	nest G542X/R553X F	TGGTTAAAGCAATAGTGTG	40,7	291 nt	Nested/ Multiplex PCR	Vector NTI Suite 6.0
6	nest G542X/R553X R	TATAAAGCAATAGAGAAATGTC	41,1		Nested/ Multiplex PCR	Vector NTI Suite 6.0
7	dele2,3 F	GACCAGACCAATTTTGGAG	41,5	121 nt	Multiplex PCR	Vector NTI Suite 6.0
8	dele2,3 R	GTACATGAACATACCTTTCC	40,7		Multiplex PCR	Vector NTI Suite 6.0
9	delF508 F	GTGGAAGAATTCATTCTG	41,3	150 nt	ASA PCR/ SSCP	Vector NTI Suite 6.0
10	delF508 M	ATTAAGAAAATATCATCGG	41,1	100 nt	ASA PCR	Vector NTI Suite 6.0
11	delF508 R	GTTTTACATAGTTTCTTACC	40,4		ASA PCR/ SSCP	Vector NTI Suite 6.0
12	R117H F	GCAGTACAGCCTCTCTTAC	40,9	143 nt	ASA PCR/ SSCP	Vector NTI Suite 6.0
13	R117H M	GGATAACAAGGAGGAAGA	40,5	96 nt	ASA PCR	Vector NTI Suite 6.0
14	R117H R	AAAAATGGCTGGGTG	40,2		ASA PCR/ SSCP	Vector NTI Suite 6.0
15	G542X F (R553X F)	AGGAAGATGTGCCTTTC	40,9	128 nt	ASA PCR/ SSCP	Vector NTI Suite 6.0
16	G542X M	GTGATTCCACCTTCTCAG	41		ASA PCR	Vector NTI Suite 6.0
17	R553X M	ACTGAGTGGAGGTCAATC	40,1	90 nt	ASA PCR	Vector NTI Suite 6.0
18	R553X R (G542X R)	CATGAATGACATTTACAGC	40,2		ASA PCR/ SSCP	Vector NTI Suite 6.0

Tabela II. Zestawy primerów stosowane w reakcji ASA PCR.

	Badana mutacja:		
	delF508	R117H	G542X R553X
Primer nr 1	delF508 F	R117H F	G542X F (R553X F)
Primer nr 2	delF508 M	R117H M	G542X M R553X M
Primer nr 3	delF508 R	R117H R	R553X R (G542X R)

Tabela III. Zestawy primerów stosowane w reakcji SSCP.

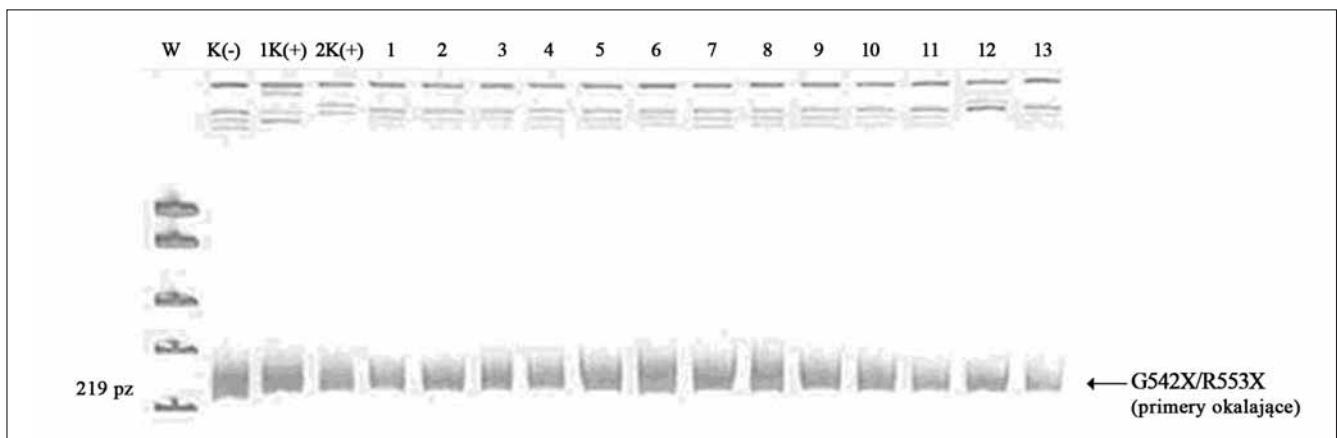
	Badana mutacja:			
	delF508	R117H	G542X	R553X
Primer nr 1	delF508 F	R117H F	G542X F (R553X F)	
Primer nr 2	delF508 R	R117H R	R553X R (G542X R)	

Wykrywanie wybranych mutacji w genie CFTR w pojedynczych komórkach...



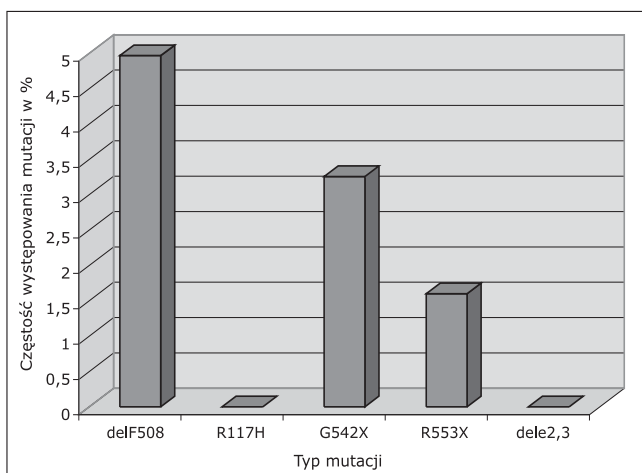
Fotografia 1. Analiza ASA PCR pod kątem mutacji delF508:

W Wzorzec wielkości DNA pUC19/Msp I
 K(-) K(-) mutacji delF508 (3 primery: delF508 F, delF508 M i delF508 R)
 K(+),2 K(+) mutacji delF508 (2 primery: delF508 M i delF508 R)
 K(+),3 K(+) mutacji delF508 (3 primery: delF508 F, delF508 M i delF508 R)
 5, 7 – wykryta mutacja delF508



Fotografia 2. Analiza SSCP pod kątem mutacji G542X i R553X:

W Wzorzec wielkości DNA pUC19/Msp I
 K(-) K(-) mutacji G542X/R553X (2 primery: G542X/R553X F i G542X/R553X R)
 1K(+) K(+) mutacji G542X (2 primery: G542X/R553X F i G542X/R553X R)
 2K(+) K(+) mutacji R553X (2 primery: G542X/R553X F i G542X/R553X R)
 12 – potwierdzona mutacja R553X



Rycina 1. Częstość występowania mutacji delF508, R117H, G542X, R553X i dele2,3 w genie CFTR w grupie pojedynczych komórek blastomerów.

W celu zwiększenia wydajności procesu amplifikacji przeprowadzono reakcję przy użyciu dwóch jednostek polimerazy. Po optymalizacji reakcji Nested Multiplex PCR zaniechano wykonywania elektroforezy agarozowej po tym etapie, a całość uzyskiwanej matrycy wykorzystywano w następnym etapie (ASA PCR), bądź jego weryfikacji (analiza SSCP).

Skonstruowany test jest testem otwartym, pozwala na analizowanie wybranych mutacji w zależności od potrzeb badanej populacji. Mutacje w genie CFTR wykazują bowiem dużą różnorodność w populacjach na całym świecie [12]. Doboru mutacji w niniejszej pracy dokonano na podstawie licznych publikacji dotyczących częstości występowania mutacji genu CFTR w Polsce [13, 14, 6, 15, 16, 17].

Określona w pracy częstość występowania badanych mutacji w blastomerach odbiegała od częstości ich występowania w populacji polskiej. Rozbieżność ta mogła jednak wynikać z niewielkiej ilości wykonanych badań.

Bielawska K, et al.

Autorzy niniejszej pracy są świadomi ograniczeń w zastosowaniu klinicznym skonstruowanego testu, związanych ze stosunkowo niewielką ilością wykrywanych nim mutacji. Test ten skierowany jest do wybranych par, u których mutacja jest znana. Większość opisanych w literaturze metod preimplantacyjnej diagnostyki mukowiscydozy opiera się, podobnie jak w niniejszej pracy, na zaprojektowaniu protokołów dla najczęściej występujących mutacji w genie CFTR [18, 19, 20, 21].

Wśród najnowszych doniesień na uwagę zasługuje stosowanie w preimplantacyjnej diagnostyce mukowiscydozy protokołów diagnostycznych analizujących jednocześnie ponad 30 mutacji w genie CFTR, najczęściej występujących w Europie Południowej [22]. Ze względu na dużą heterogenność mutacji w genie CFTR w ostatnich latach zaczęto uzupełniać identyfikację poszczególnych mutacji o analizę wysocę polimorficznych markerów otaczających gen CFTR [23] lub wewnątrzgenowych [24].

Moutou i wsp. zaproponowali użycie dwóch polimorficznych wewnątrzgenowych markerów (IVS8CA i IVS17bCA) w połączeniu z identyfikacją mutacji deltaF508. Goossens i wsp. zastosowali dodatkowo wewnątrzgenowy marker IVS17bTA oraz cztery polimorficzne markery otaczające gen (D7S490, D7S486, D7S480 oraz D7S523) [25]. Takie podejście pozwala na zaproponowanie preimplantacyjnej diagnostyki mukowiscydozy parom, u których występujące mutacje są nieznanne lub bardzo rzadkie. Metody te będą tematem zainteresowania w kolejnych pracach naszego zespołu.

Według wiedzy autorów niniejsza praca jest pierwszą w Polsce, publikującą wyniki wykrywania mutacji w genie CFTR w pojedynczych komórkach.

Wnioski

1. Opracowano test diagnostyczny dla mutacji delF508, R117H, G542X, R553X i dele2,3 (tylko dla homozygot) w genie CFTR, który można zastosować do badania pojedynczych komórek.
2. Skonstruowany test jest testem otwartym – można w nim odejmować, bądź dodawać pary primerów zaprojektowanych specyficznie do wybranych mutacji genu CFTR.

Piśmiennictwo

1. Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, [et al.]. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989, 245, 1059-1065.
2. Riordan J, Rommens J, Kerem B, [et al.]. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989, 245, 1066-1073.
3. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, [et al.]. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 1991, 10, 214-228.
4. Zielenski J, Tsui L. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet*. 1995, 29, 777-807.
5. Mazurczak T, Bal J, Oberszyn E. Zasady diagnostyki molekularnej mukowiscydozy. Identyfikacja mutacji i zmian polimorficznych w genie CFTR. *Kryteria i zasady procedury diagnostycznej oraz systemu kontroli jakości badań*. Ekspertyza naukowa, wykonana na zlecenie Ministerstwa Zdrowia. Warszawa, 1999.
6. Population variation of common cystic fibrosis mutations. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC). *Hum Mutat*. 1994, 4, 167-177.
7. Hotson D, Brutlag. Mutations to the CFTR protein. *Bioinformatics*. 2000, 13, 118-126.
8. Bal J, Sobczyńska-Tomaszewska A, Czerska K, [et al.]. Diagnostyka prenatalna mukowiscydozy w rodzinach ryzyka w Polsce – wyniki badań molekularnych. *Med Wieku Rozw*. 2004, 8, 871-883.
9. Domitrz J, Jagiełło E, Chrostowski B, [et al.]. Współczesne metody leczenia niepłodności związanej z wiekiem. *Ginekolog Pol*. 2005, 76, 747-754.
10. Handyside A, Lesko J, Tarin J, [et al.]. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation genetic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1992, 327, 905-909.
11. Holding C, Monk M. Diagnosis of beta-thalassaemia by DNA amplification in single blastomeres from mouse preimplantation embryos. *Lancet*. 1989, 2, 532-535.
12. Bobadilla J, Macek M, Fine J, [et al.]. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002, 19, 575-606.
13. Bal J, Mazurczak T, Reiss J. The frequency of mutations in exon 11 of the CF gene in Polish cystic fibrosis patients. *Acta Biochim Pol*. 1992, 39, 245-249.
14. Witt M, Bal J, Maciejko D, [et al.]. Częstość występowania mutacji genu CFTR u chorych na mukowiscydozę w Polsce. *Pediatr Pol*. 1997, 72, 665-668.
15. Estvil X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat*. 1997, 10, 135-154.
16. Dork T, Macek M, Mekus F, [et al.]. A novel 21kb deletion, CFTRdele2,3(21kb), in the CFTR gene a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet*. 2000, 106, 259-266.
17. Aznarez I, Bal J, Casals T, [et al.]. Analysis of mutations in the CFTR gene in patients diagnosed with cystic fibrosis in Poland. *Med Wieku Rozwoj*. 2000, 4, 149-159.
18. Liu J, Lissens W, Devroey P, [et al.]. Polymerase chain reaction analysis of the cystic fibrosis deltaF508 mutation in human blastomeres following oocyte injection of a single sperm from the carrier. *Prenat Diagn*. 1993, 13, 873-880.
19. Ao A, Ray P, Harper J, [et al.]. Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis (deltaF508). *Prenat Diagn*. 1996, 16, 137-142.
20. Tsai Y. Cost-effective one-step PCR amplification of cystic fibrosis DF508 fragment in a single cell for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn*. 1999, 19, 1048-1051.
21. Goossens V, Sermon K, Lissens W, [et al.]. Clinical application of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn*. 2000, 20, 571-581.
22. Sanchez-Garcia J, Benet J, Gutierrez-Mateo C, [et al.]. Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells. *Mol Hum Reprod*. 2005, 11, 463-468.
23. Dreesen J, Jacobs L, Bras M, [et al.]. Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene; a general approach for pre-implantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod*. 2000, 6, 391-396.
24. Moutou C, Gardes N, Viville S. Multiplex PCR combining deltaF508 mutation and intra-genic microsatellites of the CFTR gene for pre-implantation genetic diagnosis (PGD) of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet*. 2002, 10, 231-238.
25. Goossens V, Sermon K, Lissens W, [et al.]. Improving clinical preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis by duplex PCR using two polymorphic markers or one polymorphic marker in combination with the detection of the DF508 mutation. *Mol Hum Reprod*. 2003, 9, 559-567.