

- Serological pattern «anti-HBc alone»: report on a workshop. *J. Med. Virol.* 2000; 62(4): 450—5.
24. Stramer S.L., Zou S., Notari E.P., Foster G.A., Krysstof D.E., Musavi F. et al. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? *Transfusion.* 2012; 52(2): 440—6.
25. Katz L., Strong D.M., Tegmeier G., Stramer S. Performance of an algorithm for the reentry of volunteer blood donors deferred due to false-positive test results for antibody to hepatitis B core antigen. *Transfusion.* 2008; 48(11): 2315—22.
26. Burger R., Offergeld R. Testing plasma donations for hepatitis B core antigen (anti-HBc) in order to improve safety of cellular blood components and of quarantined fresh frozen plasma. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2005; 48(6): 698—9.
27. Kiely P., Margaritis A.R., Seed C.R., Yang H.; Australian Red Cross Blood Service NAT Study Group. Hepatitis B virus nucleic acid amplification testing of Australian blood donors highlights the complexity of confirming occult hepatitis B virus infection. *Transfusion.* 2014; 54(8): 2084—91.

Received 10.12.15

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-003.829.1-055.5/7-074:577.21.08

Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А.

### СРАВНЕНИЕ ТРЕХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ HFE, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ НАСЛЕДСТВЕННОГО ГЕМОХРОМАТОЗА

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Российская Федерация

В 97% всех случаев наследственного гемохроматоза (НГХ) причиной заболевания являются три основные мутации в гене HFE: C282Y, H63D и S65C. Известно, что около 85% пациентов с НГХ являются либо гомозиготными носителями мутации C282Y, либо несут компаунд-гетерозиготу C282Y/H63D. Таким образом, важное место в диагностике НГХ занимает молекулярно-генетическое исследование, направленное на определения этих трех мутаций в гене HFE. Цель настоящего исследования заключается в разработке методик для выявления мутаций C282Y, H63D и S65C на основе двух молекулярно-генетических методов — ПЦР в режиме реального времени и пиросеквенирования. В качестве референсного метода использовали опубликованную методику (С.В. Моyses и соавт., 2008). С помощью этих методик было проанализировано 129 образцов ДНК, дискордантных результатов получено не было. Среди исследованных клинических образцов ДНК мутантные аллели гена HFE были найдены в 42 (32,5%) образцах. Мутация C282Y обнаружена в гетерозиготном состоянии в 4 (3,1%) образцах, мутация H63D встречалась в гетерозиготном состоянии в 31 (24%) образце и в гомозиготном в 4 образцах (3%). Мутация S65C встречалась в гетерозиготном состоянии в одном образце (0,8%) и в одном образце (0,8%) детектировалась компаунд-гетерозигота H63D/S65C. Проведена сравнительная характеристика этих 3 методик по следующим параметрам: время, количество этапов анализа и удобство интерпретации результатов. К основным достоинствам метода, основанного на ПЦР в режиме реального времени, можно отнести время проведения анализа. К основным достоинствам пиросеквенирования — автоматическое определение генотипа.

**Ключевые слова:** наследственный гемохроматоз; ген HFE; мутации C282Y, H63D, S65C; ПЦР в режиме реального времени; метод пиросеквенирования.

**Для цитирования:** Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А. Сравнение Трех молекулярно-генетических методик для определения основных мутаций в гене HFE, связанных с развитием наследственного гемохроматоза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (5)-316-320.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-5-316-320

Axelrod E.V., Mironov K.O., Dunaeva E.A., Shipulin G.A.

#### THE COMPARISON OF THREE MOLECULAR GENETIC TECHNIQUES FOR IDENTIFYING MAJOR MUTATIONS IN GENE HFE RELATED TO DEVELOPMENT OF INHERENT HEMOCHROMATOSIS

The central research institute of epidemiology of Rospotrebnadzor, 111123 Moscow, Russia

The three main mutations in gene HFE (C282Y, H63D, S65C) are the cause of development of 97% of cases of inherent hemochromatosis. It is known that about 85% of patients with inherent hemochromatosis are either homo-zygotic agents of mutation C282Y or carry compound-heterozygote C282Y/H63D. Therefore, the molecular genetic study intended for detection of these three mutations in gene HFE takes important place in diagnostic of inherent hemochromatosis. The study was organized to develop methods for detection of mutations C282Y, H63D, S65C on the basis of two molecular genetic methods - polymerase chain reaction in real-time and

*pyrosequencing. As reference method was used published method by Moyses C.B. et al. (2008). These methods were applied to analyzing 129 DNA samples. There were no discordant results. Among analyzed clinical DNA samples, mutant alleles of gene HFE were detected in 42 samples (32.5%) The mutation C282Y is detected in heterozygotic condition in 4 samples (3.1%); mutation H63D was detected in heterozygotic condition in 31 samples (24%) and in homo-zygotic condition in 4 samples (4%). The mutation S65C encountered in heterozygotic condition in one sample (0.8%) and in one sample compound-heterozygote H63D/S65C was detected (0.8%). The comparative characteristic of these three methods was made according the following parameters: time, number of analysis stages and convenience of interpretation of results. The main merit of method based on polymerase chain reaction in real-time is time of analysis implementation. The main merit of method based on pyrosequencing is automatic identification of genotype.*

**Key words:** *inherent hemochromatosis; gene HFE; mutations C282Y, H63D, S65C; polymerase chain reaction in real-time; method of pyrosequencing.*

**For citation:** Axelrod E.V., Mironov K.O., Dunaieva E.A., Shipulin G.A. The comparison of three molecular genetic techniques for identifying major mutations in gene HFE related to development of inherent hemochromatosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (5) : 316-320. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-316-320

**For correspondence:** *Axelrod E.V.*, candidate of biological sciences, research worker of research group of development of new methods of detection of genetic polymorphisms. e-mail: sil-elia@rambler.ru

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

**Financing.** *The study had no sponsor support.*

Received 10.12.15  
Accepted 15.12.15

**Введение.** Наследственный гемохроматоз (НГХ) — аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с нарушением метаболизма железа, что приводит к его повышенному накоплению в органах и тканях. Заболевание встречается с частотой 3—8 случаев на 1000 человек в европейских популяциях [1]. Осложнениями НГХ могут быть такие тяжелые клинические состояния, как цирроз печени, застойная сердечная недостаточность, сердечная аритмия, эндокринный панкреатит. Большинство случаев НГХ связано с тремя основными миссенс-мутациями в гене HFE, кодирующем трансмембранный гликопротеин: C282Y (845 G > A, rs1800562), H63D (187 C > G, rs1799945) и S65C (193 A > T, rs1800730) [2]. Эти мутации приводят к нарушению функций белка HFE, регулирующего абсорбцию железа [3]. Своевременная диагностика НГХ включает комплекс клинических и лабораторных исследований, среди которых, кроме биохимических анализов, важное место занимает молекулярно-генетическое исследование, направленное на определения основных мутаций в гене HFE, что необходимо для назначения терапии и коррекции лечения [4].

В северо-европейских популяциях около 0,5% людей являются гомозиготными носителями мутации C282Y и 13% — гетерозиготными носителями. Частота мутации H63D варьирует от 10 до 30% [5]. Частота мутации S65C составляет 1,5—2% и она не встречается в популяциях Азии и Африки [6]. В России частота мутантных аллелей в гене HFE составляет примерно 3,7%, для мутаций C282Y, H63D и S65C 13% и 0,8%, соответственно [7—9].

Среди всех больных НГХ около 85% случаев заболевания связаны с гомозиготным носительством мутации C282Y, при этом почти все пациенты также являются гомозиготными носителями мутации H63D [10]. При гетерозиготном носительстве мутации H63D обмен железа, как правило, нарушается незначительно. В то же время одновременное наличие мутаций H63D и S65C коррелирует с появлением у больных клинически выраженных симптомов.

Цель данного исследования заключалась в разработке и сравнительной характеристике двух диагностических методик для выявления мутаций C282Y, H63D и S65C в гене HFE. Одна методика основана на ПЦР в режиме реального времени с использованием конформационно-блокированных олигонуклеотидных зондов, а вторая — на методике определения нуклеотидной последовательности соответствующих

фрагментов гена HFE с помощью пиросеквенирования. В качестве метода сравнения была использована ранее опубликованная методика для определения этих мутаций, основанная на переносе энергии флуоресцентного резонанса (ПЦР-FRET) [11].

**Материал и методы.** Исследовано 129 образцов ДНК, выделенных из крови лиц, проживающих на территории Москвы. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов РИБО-преп с предварительной обработкой реагентом «Гемолитик» и разведенных до концентрации 1 нг/мкл. Для измерения концентрации ДНК использовали методику для количественного определения копий гена β-глобина, основанную на ПЦР в режиме реального времени. Все использованные наборы реагентов произведены в ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» (Москва).

**Методика 1 (пиросеквенирование).** Реакцию пиросеквенирования проводили с помощью системы генетического анализа PyroMarkQ24 (Qiagen, Германия). Для амплификации участков гена HFE, несущих мутации C282Y, H63D и S65C, использовали две ПЦР-смеси. Первая ПЦР-смесь содержит праймеры для определения мутации C282Y, вторая — для мутаций S65C и H63D. Подбор праймеров для проведения пиросеквенирования выполнен с учетом рекомендаций производителя оборудования. Места отжига праймеров для амплификации и секвенирования показаны на рис. 1. Постановку ПЦР, пробоподготовку и пиросеквенирование проводили в соответствии с инструкцией к набору реагентов АмплиСенсО Пироскрин (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» (Москва) и рекомендациями фирмы «Qiagen» (Германия). Анализ области изучаемых полиморфизмов осуществляется автоматически программным обеспечением прибора (версия 2.0.6) на основании относительных высот сигналов в полиморфной области по отношению к сигналам, соответствующих референсным нуклеотидам [12]. Для определения нуклеотидной последовательности области гена HFE, содержащего мутацию C282Y, использовали следующий порядок добавления нуклеотидов в реакционную смесь: GCTACGTA, при анализе полученных результатов использовали последовательность C/TACGTATAT. Для области гена HFE, содержащей мутации H63D и S65C, использовали следующий порядок подачи нуклеотидов в реакционную смесь: TCGATGACGATGTC, при анализе результатов использовали последовательность C/GATGAGA/TGTCGCCG.

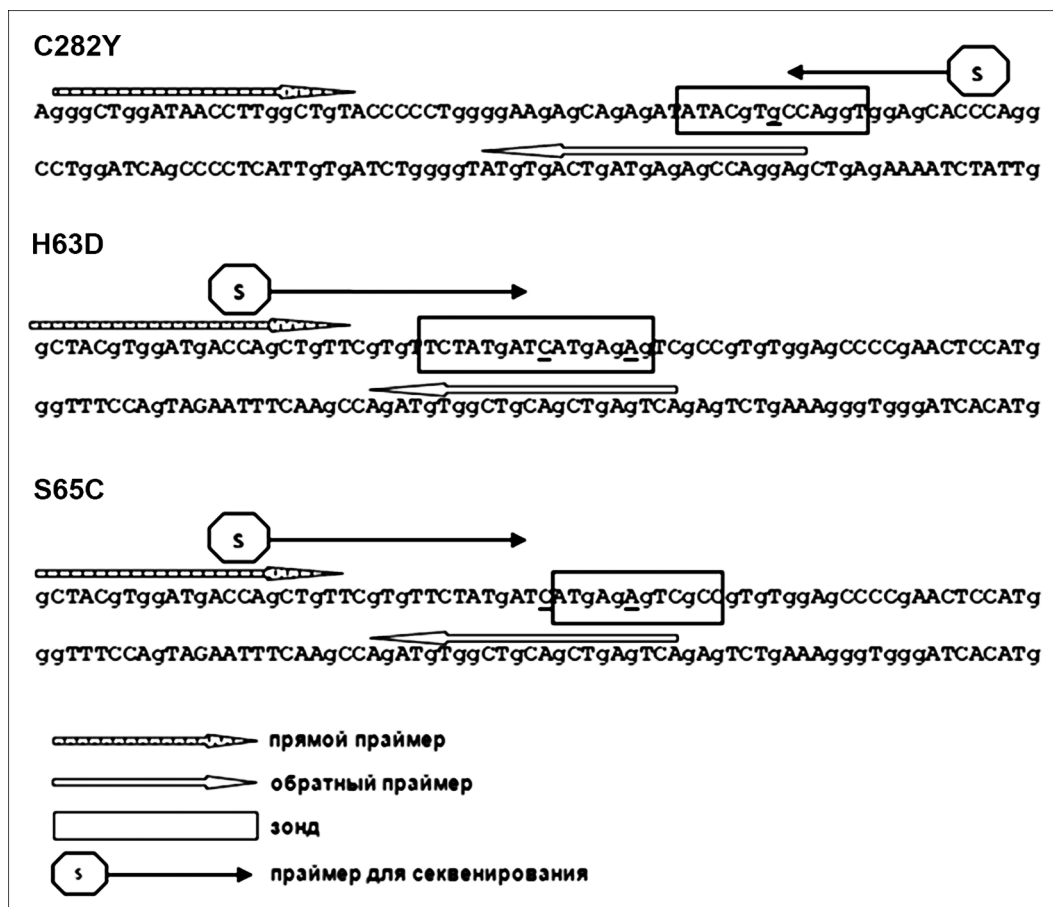


Рис. 1. Олигонуклеотиды для проведения ПЦР в режиме реального времени и пиросеквенирования фрагментов гена HFE, содержащих мутации C282Y, H63D и S65C (полиморфные нуклеотиды отмечены подчеркиванием).

**Методика 2 (ПЦР в режиме реального времени).** Определение генотипов C282Y, H63D и S65C проводили с помощью двух ПЦР-смесей, содержащих те же праймеры, что и при пиросеквенировании, в режиме реального времени на амплификаторах Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия). Первая ПЦР-смесь содержала праймеры и 4 зонда для определения мутаций C282Y/H63D, вторая — праймеры и 2 зонда для определения мутации S65C (см. рис. 1). Каждый зонд содержал 4–5 конформационно-блокированных нуклеотида. ПЦР ставили по следующей схеме: реакционная смесь объемом 25 мкл включала: смесь 0,44 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 0,2 мкМ праймеров, 0,1 мкМ зондов, «Полимераза Taq-F» — 0,5 мкл, ОТ-ПЦР-смесь — 4,5 мкл и выделенная ДНК — 10 мкл. Использовали следующую программу амплификации: 95°C — 15 мин (1 цикл); 95°C — 10 с и 60°C — 20 с (45 циклов). Для определения генотипа исследуемых образцов ДНК устанавливали значения пороговых циклов для 4 каналов флуоресценции: Green (для мутации H63D детектируется аллель С в первой реакционной смеси, для мутации S65C аллель А — во второй реакционной смеси), Yellow (для мутации H63D детектируется аллель G в первой реакционной смеси, для мутации S65C аллель Т — во второй), Orange (для мутации C282Y детектируется аллель G в первой реакционной смеси) и Red (для мутации C282Y детектируется аллель А в первой реакционной смеси), и рассчитывали разность значений пороговых циклов между каналами Green и Yellow для определения мутаций H63D и S65C и между каналами Orange и Red для определения мутации C282Y.

**Методика 3 (ПЦР-FRET).** В качестве метода сравнения использована методика, предложенная С.В. Moyses и соавт. [11]. Амплификацию проводили на приборах Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (фирмы «Qiagen», Германия); использованы программа амплификации и алгоритм учета результатов согласно методике [11]. Определение генотипов C282Y, H63D и S65C референсным методом ПЦР-FRET осуществляли по температуре плавления дуплекса амплифицированной ДНК и детектирующих зондов в одной ПЦР-смеси.

При постановке ПЦР в режиме реального времени (методика 2) и ПЦР-FRET (методика 3) были использованы положительный и отрицательный контрольные образцы. В качестве положительного контроля использовали клонированные в вектор pGem-T нуклеотидные последовательности гена HFE, фланкированные соответствующими праймерами (см. рис. 1), как содержащие, так и не содержащие мутации C282Y, H63D и S65C. Клонирование проводили по стандартной методике с использованием реагентов производства Promega и Agilent Technologies (США) [13].

Все реактивы, использованные при разработке методик 1 и 2, а также реагенты для методики 3 были произведены в ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» (Москва), за исключением стрептовидиновой сефарозы (реагент для прободготовки [12]) и набора PyroMark Gold Q96 Reagents (5 × 96) («Qiagen», Германия).

**Результаты.** С помощью разработанной методики на основе метода пиросеквенирования показано, что среди 129 исследованных образцов ДНК мутантные аллели гена HFE

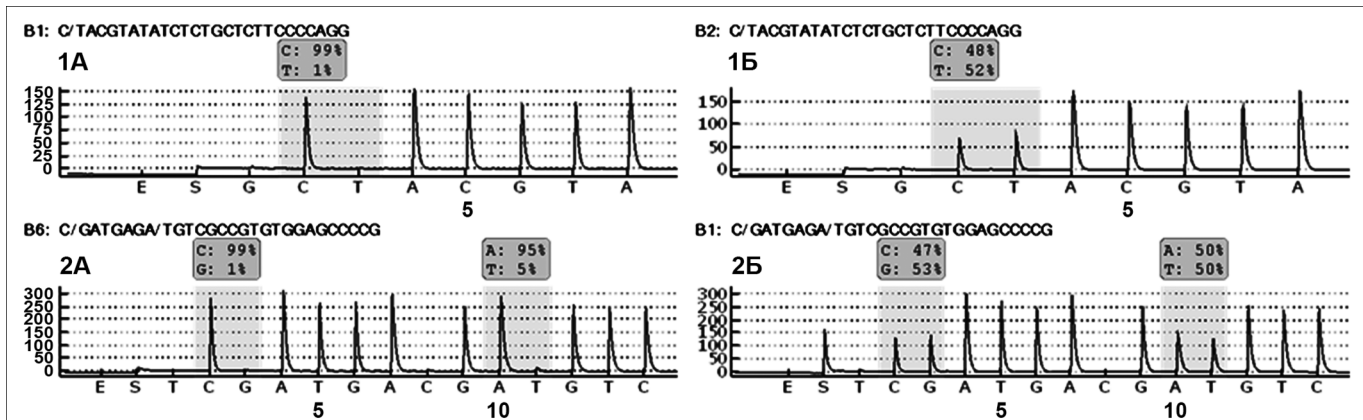


Рис. 2. Примеры результатов пиросеквенирования фрагментов гена HFE.

1 — результат секвенирования фрагмента с мутацией С282У: А — мутация не обнаружена (генотип GG), Б — мутация обнаружена в гетерозиготном состоянии (генотип GA); 2 — результат секвенирования фрагмента с мутациями Н63D и S65С: А — мутация не обнаружена (генотипы CC и AA), Б — компаунд-гетерозигота (генотипы CG и AT).

были найдены в 42 (32,5%) образцах. Мутация С282У обнаружена в гетерозиготном состоянии в 4 (3,1%) образцах; с наибольшей частотой была выявлена мутация Н63D, которая встречалась в гетерозиготном состоянии в 31 (24%) образце и в гомозиготном в 4 (3%) образцах. Мутация S65C встречалась в гетерозиготном состоянии в 1 (0,8%) образце, и в 1 (0,8%) образце детектировали компаунд-гетерозиготу Н63D/S65C. Таким образом, частоты мутантных аллелей составили 3,1%, для мутаций С282У, Н63D и S65C 27 и 0,8%, соответственно. На рис. 2 приведены примеры детектирования генотипов GG и GA мутации С282У, а также генотипов CC/AA и CG/AT мутаций Н63D/S65C. Поскольку праймер для секвенирования участка гена HFE, содержащего мутацию С282У, ориентирован в обратном направлении, выявленные генотипы следует обозначать как CC и CT.

Исследование генетических локусов гена HFE методом ПЦР в режиме реального времени показало такие же результаты генотипирования, как и полученные методом пиросеквенирования.

**Обсуждение.** Разработка и апробация двух диагностических методик, а также валидация результатов референсным методом позволили нам оценить преимущества и недостатки каждого из них по следующим основным параметрам: время проведения реакции; количество реакционных смесей, необходимых для одновременного детектирования трех анализируемых мутаций, а также различные возможности и удобство интерпретации результатов. Сравнение 3 методик показало, что минимальное время затрачивается на проведение ПЦР в режиме реального времени (около 110 мин). Примерно на 20 мин больше протекает реакция ПЦР-FRET (около 130 мин). Больше всего времени занимает постановка реакции пиросеквенирования, включающей 2 этапа — амплификацию продукта реакции ПЦР (около 110 мин) и последующее определение нуклеотидной последовательности, которое занимает около 30 мин. Таким образом, общее время анализа составляет около 140 мин.

Проведение реакций ПЦР в режиме реального времени и пиросеквенирования предполагает использование 2 ПЦР-смесей: первая ПЦР-смесь для одновременного определения 2 мутаций, а вторая ПЦР-смесь для определения 3-й мутации. В методике ПЦР-FRET используется одна ПЦР-смесь, что упрощает процедуру проведения анализа и снижает риск контаминации.

Интерпретация результатов, полученных с помощью этих

методик, может проводиться по-разному, в зависимости от возможностей программного обеспечения используемого прибора. К основным достоинствам метода пиросеквенирования можно отнести автоматический анализ результатов секвенирования [12]. В отличие от пиросеквенирования обработка результатов и определение генотипов, полученных методом ПЦР в режиме реального времени и с помощью ПЦР-FRET [11], проводится на основе анализа кривых накопления флуоресценции (методика 2) или анализа дифференциальных графиков кривых плавления (методика 3) с помощью различных инструментов программного обеспечения приборов для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Если задачей работы является исследование сразу большого количества образцов, методом ПЦР в режиме реального времени одновременно возможно анализировать 48 проб, а ПЦР-FRET — 96. При проведении секвенирования на приборе PyroMark Q24 в одной постановке можно поставить 12 или 24 образца (при одновременной амплификации всех трех мишеней). Если используются другие пиросеквенаторы, такие как Qseq (Bio Molecular System, Австралия) [14], или другие системы генетического анализа серии PyroMark, например PyroMark Q96 ID (Qiagen, Германия), количество одновременно анализируемых образцов может быть увеличено до 48 и 96, соответственно.

К дополнительным преимуществам пиросеквенирования также следует отнести отсутствие необходимости в использовании ПКО, в то время как при любых вариантах проведения ПЦР в режиме реального времени (методики 2 и 3) ПКО используется обязательно.

**Заключение.** Таким образом, разработанные нами методики на основе двух молекулярно-генетических методов — ПЦР в реальном времени и пиросеквенирования позволяют достаточно быстро проводить генетический анализ локусов гена HFE для выявления мутаций С282У, Н63D и S65C. Их использование целесообразно в клинической практике для выявления лиц, имеющих генетическую предрасположенность к наследственному гемохроматозу. Полученные нами результаты распределения мутантных аллелей в гене HFE показали, что их частота составила 3,1%, для С282У, Н63D и S65C, 27 и 0,8% соответственно, что согласуется с данными по распространению этих мутаций на территории России [7, 8].

*Исследование не имело спонсорской поддержки.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—6, 8, 10—11, 13  
см. REFERENCES)

1. Ньюсбаум Р.Л., Мак-Иннес Р.Р., Хантингтон В.Ф. *Медицинская генетика*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
7. Михайлова С.В., Кобзев В.Ф., Куликов И.В., Ромашенко А.Г., Хаснулин В.И., Воевода М.И. Полиморфизм гена HFE, ассоциированного с наследственным гемохроматозом, в популяциях России. *Генетика*. 2003; 39 (7): 988—95.
9. Воевода М.И., Кобзев В.Ф., Ромашенко А.Г., Хаснулин В.И., Михайлова С.В. Распространение аллелей C282Y, H63D и S65C гена HFE и предрасположенности к нарушениям метаболизма железа в популяциях России. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2001; (4): 13—7.
12. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П. Детекция генетических полиморфизмов с использованием системы генетического анализа на основе пиросеквенирования RугоMark Q24. *Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией*. 2011; (4): 39—48.
14. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Шипулин Г.А. Апробация новой системы генетического анализа для пиросеквенирования «QSEQ». *Молекулярная диагностика*. 2014; (4): 392—4.

Поступила 10.12.15

REFERENCES

1. N'yussbaum R.L., Mak-Innes R.R., Khantington V.F. *Genetics in Medicine [Meditsinskaya genetika]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
2. Distant S., Robson K.J., Graham-Campbell J., Arnaiz-Villena A., Brissot P., Worwood M. The origin and spread of the HFE-C282Y haemochromatosis mutation. *Hum. Genet.* 2004; 115 (4): 269—79.
3. Hanson E.H., Imperatore G., Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 2001; 154 (3): 193—206.
4. Allen K.J., Gurrin L.C., Constantine C.C., Osborne N.J., Delatycki M.B., Nicoll A.J. et al. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358 (3): 221—30.
5. Merryweather-Clarke A.T., Pointon J.J., Jouanolle A.M., Rochette J., Robson K.J. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet. Test.* 2000; 4 (2): 183—98.
6. Merryweather-Clarke A.T., Pointon J.J., Shearman J.D., Robson K.J. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J. Med. Genet.* 1997; 34 (4): 275—8.
7. Mikhaylova S.V., Kobzev V.F., Kulikov I.V., Romashchenko A.G., Khasnulin V.I., Voevoda M.I. Polymorphism of the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis in populations of Russia. *Genetika*. 2003; 39 (7): 988—95. (in Russian)
8. Potekhina E.S., Lavrov A.V., Samokhodskaya L.M., Efimenko A.Y., Balatskiy A.V., Baev A.A. et al. Unique genetic profile of hereditary hemochromatosis in Russians: high frequency of C282Y mutation in population, but not in patients. *Blood Cells Mol. Dis.* 2005; 35 (2): 182—8.
9. Voevoda M.I., Kobzev V.F., Romashchenko A.G., Khasnulin V.I., Mikhaylova S.V. The distribution of allele C282Y, H63D and S65C HFE gene and the susceptibility to disturbances of iron metabolism in populations of Russia. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2001; (4): 13—7. (in Russian)
10. Becker F., van El C.G., Ibarreta D., Zika E., Hogarth S., Borry P. et al. Genetic testing and common disorders in a public health framework: how to assess relevance and possibilities. *Eur. J. Hum. Genet.* 2011; 19 (Suppl. 1): S6—44.
11. Moyses C.B., Moreira E.S., Asprino P.F., Guimaraes G.S., Alberto F.L. Simultaneous detection of the C282Y, H63D and S65C mutations in the hemochromatosis gene using quenched-FRET real time PCR. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2008; 41 (10): 833—8.
12. Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P. Detection of genetic polymorphisms using genetic analysis system based on pyrosequencing method PyroMark Q24. *Spravochnik zaveduyushchego kliniko-diagnosticheskoy laboratoriyey*. 2011; (4): 39—48. (in Russian)
13. Sambrook J., Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: CSHL Press; 2001; Vol. 1—3.
14. Dunaeva E.A., Mironov K.O., Shipulin G.A. Approbation of «QSEQ» — the new system of genetic analysis for pyrosequencing. *Molekulyarnaya diagnostika*. 2014; (4): 392—4. (in Russian)

Received 10.12.15