

Детекция генетических полиморфизмов с использованием системы генетического анализа на основе пиросеквенирования PyroMark Q24

К.О. Миронов

канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник,

Е.А. Дунаева

мл. науч. сотрудник,

О.П. Дрибноходова

канд. биол. наук, научный сотрудник,

В.Г. Дедков

научный сотрудник,

Г.А. Шипулин

канд. мед. наук, заведующий отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии

ФГУН “Центральный НИИ эпидемиологии” Роспотребнадзора

Наследственные факторы играют важную роль в возникновении практически всех заболеваний человека. В зависимости от вклада генетических особенностей организма в патогенез заболевания выделяют группы моногенных и мультифакториальных болезней. Моногенные наследственные болезни обусловлены мутациями в одном гене. На сегодняшний день описано несколько тысяч наследственных болезней, но несмотря на это их вклад в общую заболеваемость и смертность оценивается примерно в 1%. Значительно более распространенными являются мультифакториальные заболевания, обусловленные комбинированным действием неблагоприятных факторов окружающей среды и генетических факторов риска, формирующих наследственную предрасположенность к заболеванию. К мультифакториальным заболеваниям относится подавляющее большинство хронических болезней человека, связанных с поражением сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной и других систем организма. Также к этой группе заболеваний можно отнести некоторые инфекционные болезни, вероятность возникновения и тяжесть течения которых может быть детерминирована на генетическом уровне. На сроки проявления, характер течения



и прогноз мультифакториальных заболеваний генетические и средовые факторы оказывают соизмеримое влияние.

На сегодняшний день известно несколько сотен генетических локусов, для которых показана ассоциация с развитием мультифакториальных заболеваний и патологических синдромов. Риск возникновения мультифакториального заболевания, как правило, обусловлен полиморфизмами в нескольких генах, которые реализуются только при наличии соответствующих неблагоприятных средовых факторов. В связи с этим выявление аллелей риска в генетических локусах, связанных с риском развития мультифакториальных заболеваний, является важной задачей профилактической медицины. Поскольку фенотипическое проявление полиморфизмов всегда связано с провоцирующими факторами внешней среды, данные о генотипе могут учитываться при консультировании пациентов, наиболее подверженных риску возникновения того или иного заболевания, с целью первичной профилактики. Генотипирование клинически значимых генетических локусов позволяет выявлять группы лиц с высоким риском развития заболевания до клинического проявления симптомов, а также определять риск развития осложнений основного заболевания и осложнений, связанных с хирургическими вмешательствами или применением лекарств.

Генетические полиморфизмы

При изучении генетической предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям объектом клинического исследования являются уже известные полиморфные участки в геноме человека (генетические полиморфизмы), вовлеченные в патогенез заболевания, или генетические локусы, по данным популяционных исследований ассоциированные с риском возникновения заболевания. Применение методологии полногеномного скрининга ассоциаций (GWAS, Genome-Wide Association Study) позволяет определить генетические локусы, связанные с развитием наиболее частых мультифакториальных заболеваний. Информация о генетических полиморфизмах в геноме человека доступна через соответствующие международные специализированные онлайн базы данных.

Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов используется широкий спектр молекулярно-биологических методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). К наиболее распространенным методам детекции однонуклеотидных полиморфизмов можно отнести анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, аллель-специфическую ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, гибридизацию с использованием ДНК-чипов, минисеквенирование с последующим масс-спектрометрическим анализом, пиросеквенирование и секвенирование ДНК. На основе перечисленных методов возможно создание методик детекции тех или иных однонуклеотидных полиморфизмов, но только секвенирование и пиросеквенирование являются прямыми методами детекции нуклеотидной последовательности.

На сегодняшний день наиболее распространенным методом секвенирования является метод, предложенный в 1977 г. Сэнгером (Sanger). Современный вариант секвенирования по Сэнгеру основан на ферментативном секвенировании (элонгации цепи ДНК) с использованием дидезокситерминаторов и последующим разделением продуктов амплификации методом капиллярного гель-электрофореза. Широко распространенные в лабораторной практике варианты методики позволяют секвенировать фрагменты ДНК длиной от 300 до 700 п. н. Для детекции полиморфных локусов в геноме человека необходимо проводить секвенирование анализируемого фрагмента в двух направлениях, а при анализе результатов секвенирования использовать специализированное программное обеспечение, которое не всегда позволяет детектировать полиморфизмы в автоматическом режиме.

Сложности и относительная трудоемкость методики секвенирования по Сэнгеру ограничивают ее применение для задач, связанных с детекцией однонуклеотидных полиморфизмов. Гораздо более удобной платформой, специально разработанной для детекции однонуклеотидных полиморфизмов, является система генетического анализа RyoMark, основанная на методе пиросеквенирования.

Метод пиросеквенирования

Метод пиросеквенирования, также обозначаемый как пиросеквенирующий синтез или секвенирование путем синтеза, разработан Полом Ниროном (Pål Nyren) в Королевском техническом институте (Стокгольм, Швеция) в 1996 г. Метод основан на детекции высвобождающегося при синтезе ДНК пирофосфата. В результате ферментативного превращения пирофосфата регистрируется хемилюминесцентный сигнал. Высвобождение пирофосфата осуществляется после встраивания соответствующего нуклеотида во вновь синтезируемую цепь ДНК на матрице комплементарной цепи. В реакции пиросеквенирующего синтеза участвуют четыре фермента. Схема и основные этапы реакции представлены на рис. 1.

Пиросеквенирующий синтез включает в себя следующие этапы:

1. К дуплексу ДНК-матрица/секвенирующий праймер добавляется смесь ферментов ("E") и смесь субстратов ("S"). Смесь "E" содержит следующие ферменты: ДНК-полимеразу, АТФ-сульфурилазу, люциферазу и апиразу; смесь "S" содержит субстраты ферментов аденозин-5'-фосфосульфат и люциферин.

2. При добавлении в реакцию смесь первого нуклеотида (dNTP) ДНК-полимеразы катализирует присоединение нуклеотида к праймеру для секвенирования. Если добавляемый нуклеотид комплементарен последовательности ДНК-матрицы, присоединение нуклеотида к 3'-концу секвенирующего праймера (синтез ДНК) сопровождается выделением пирофосфата (PPi) в количестве, эквимолярном количеству встроившихся нуклеотидов.

3. АТФ-сульфурилаза катализирует превращение пирофосфата в АТФ (АТР) в присутствии аденозин-5'-фосфосульфата. Образовавшаяся АТФ

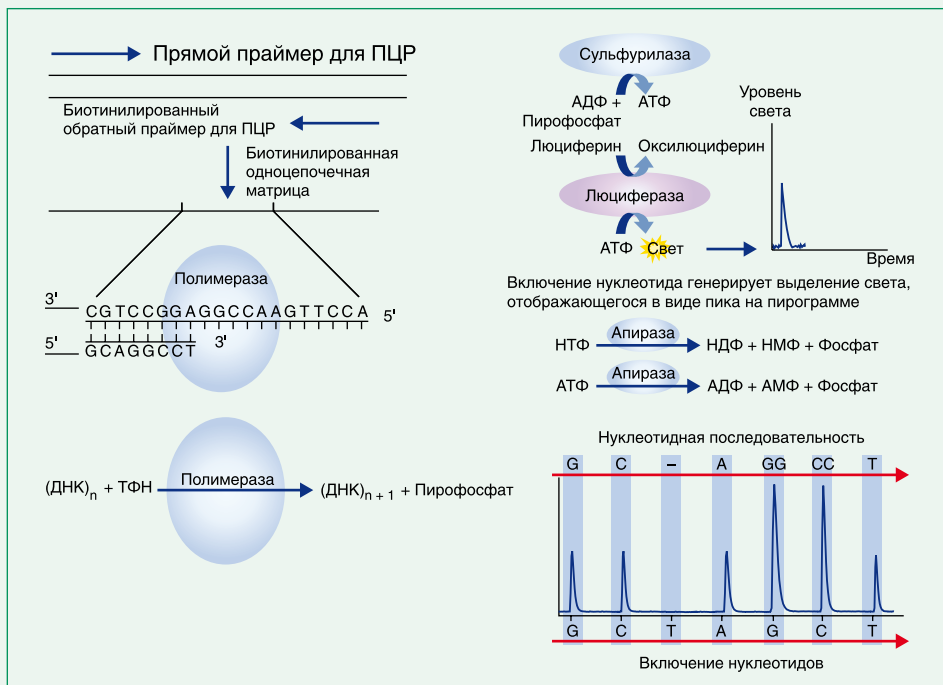


Рис. 1. Схема реакции пиросеквенирующего синтеза

запускает люциферазо-опосредованную реакцию окисления люциферина в оксилуциферин, в результате чего происходит образование видимого света в количестве, пропорциональном количеству АТФ.

4. Свет детектируется CCD-камерой прибора-пиросеквентатора и отображается в виде пиков на графике (пирограмме). Высота пиков пропорциональна количеству нуклеотидов, встроившихся во вновь синтезированную, комплементарную ДНК-матрицу, цепь ДНК.

5. В течение всей реакции фермент апираза разрушает невстроившиеся нуклеотиды и избыток АТФ. После разрушения невстроенных нуклеотидов в реакционную смесь подается новый нуклеотид.

Добавление нуклеотидов в реакционную смесь осуществляется последовательно в соответствии с нуклеотидной последовательностью анализируемого генетического локуса. В течение реакции комплементарная цепь ДНК достраивается, и в соответствии с детектируемыми сигналами на пирограмме определяется нуклеотидная последовательность исследуемого генетического локуса.

Этапы проведения анализа

Определение нуклеотидной последовательности анализируемого генетического локуса с помощью систем генетического анализа PyroMark состоит из этапов, представленных на рис. 2.

Первым этапом анализа является наработка ампликона, содержащего полиморфный генетический локус. Этап включает в себя выделение ДНК из клинического материала и постановку ПЦР. Для выделения ДНК могут быть использованы комплекты реагентов “РИБО-преп” или “ДНК-сорб-В” производства ФГУН “Центральный НИИ эпидемиологии” Роспотребнадзора. При амплификации фрагмента ДНК один из пары праймеров должен быть связан на 5'-конце с биотином; цепь ДНК, которая послужит матрицей для пиросеквенирования, амплифицируется с биотинилированным праймером. В зависимости от направления секвенирования возможны два типа анализа: прямой анализ (forward analysis) и обратный анализ (reverse analysis). В первом случае с биотином связан обратный праймер для амплификации, во втором – прямой праймер для амплификации.

После амплификации проводится пробоподготовка ампликона. ПЦР-фрагмент инкубируется с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином. При помощи полуавтоматической вакуумно-фильтрационной станции (Vacuum Prep Workstation) проводится щелочная денатурация ампликона и серия отмывок, в результате которых образуется одноцепочечный ПЦР-продукт, который иммобилизуется на твердую поверхность (планшет для секвенирования) и используется как матрица в реакции пиросеквенирующего синтеза. При проведении очистки и щелочной денатурации ПЦР-продукта может быть использован набор для пробоподготовки “ПИРО-преп” производства ФГУН “Центральный НИИ эпидемиологии” Роспотребнадзора. К одноцепочечному ПЦР-продукту добавляется секвенирующий праймер, который отжигается в области анализируемого гене-

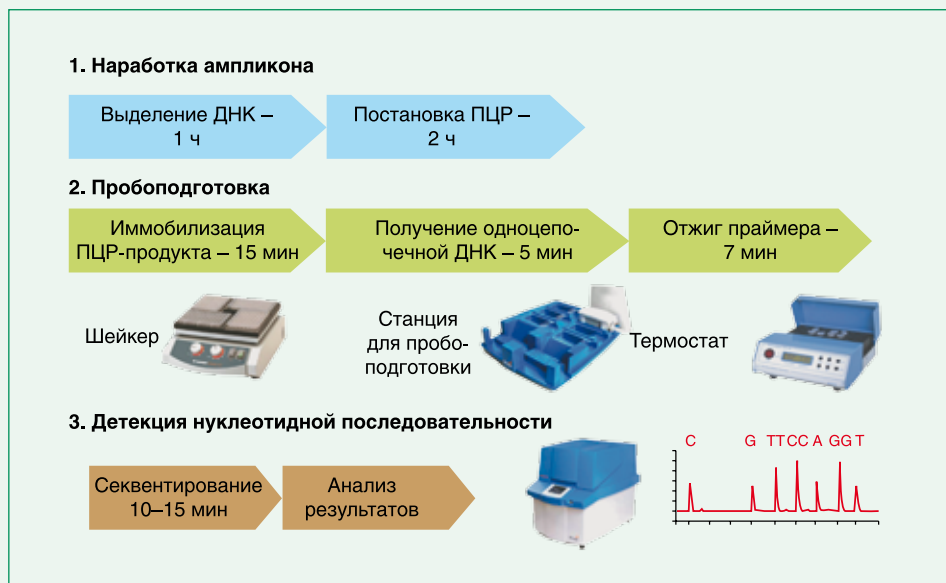


Рис. 2. Этапы проведения анализа с помощью системы генетического анализа PyroMark Q24 – необходимое оборудование и хронометраж



тического локуса, образуя дуплекс ДНК-матрица / секвенирующий праймер, необходимый для проведения реакции пиросеквенирующего синтеза. Весь этап пробоподготовки ПЦР-продукта занимает примерно 30 мин.

Заключительным этапом анализа является секвенирование ПЦР-продукта – проведение реакции пиросеквенирующего синтеза и анализ полученных результатов. Детекция результатов пиросеквенирующего синтеза проводится автоматически в режиме реального времени с помощью пиросеквенаторов серии PyroMark.

Система генетического анализа PyroMark Q24

Прибор PyroMark Q24 предназначен для одновременного секвенирования до 24 образцов (рис. 3). Программное обеспечение PyroMark Q24 Software поддерживает три типа тестов для дизайна следующих исследований: количественной оценки аллельной встречаемости, анализа статуса метилирования генов и анализа полиморфных нуклеотидных последовательностей. Прибор PyroMark Q24 и необходимое дополнительное оборудование занимают минимум рабочего пространства. В течение рабочего дня могут быть осуществлены несколько последовательных запусков прибора. Тесты, созданные для работы с прибором PyroMark Q24, совместимы с другими приборами серии PyroMark, обладающими большей пропускной способностью.

На мониторе прибора демонстрируется информация о секвенировании в режиме реального времени. Все полученные данные сохраняются на жестком диске прибора и флеш-карте. Это позволяет перемещать шаблоны тестов и выполненные эксперименты на любой компьютер с установленным программным обеспечением PyroMark Q24 Software для анализа данных. Если ориентироваться на занимаемое рабочее пространство, вре-



Рис. 3. Система генетического анализа PyroMark Q24

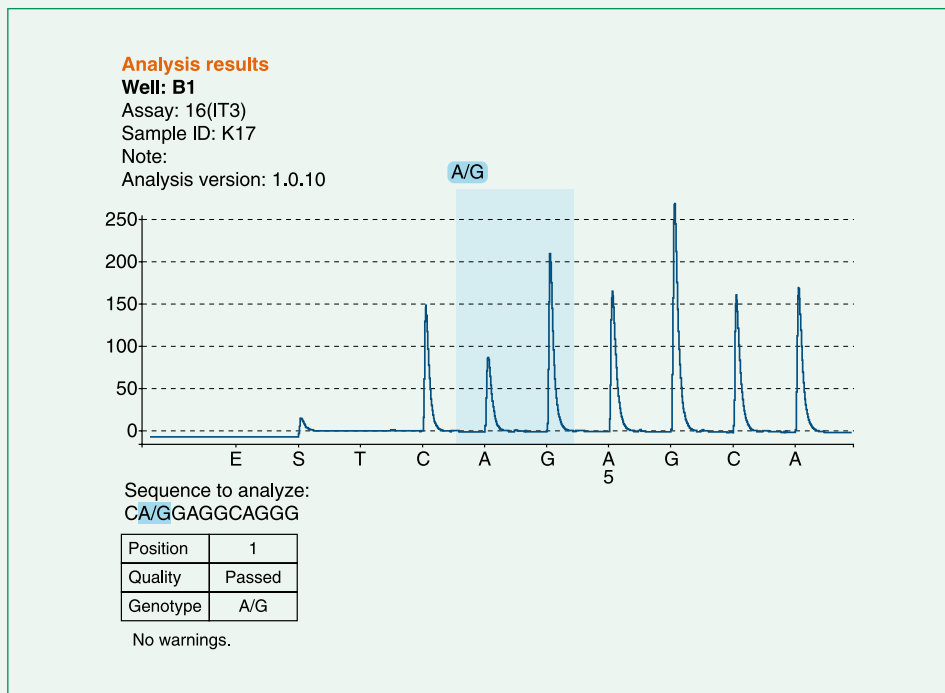


Рис. 4. Пример детекции полиморфизма L33P T>C (rs5918) в гене тромбоцитарного рецептора фибриногена (профиль “Агрегационные факторы системы свертывания крови”)

менные ограничения и разнообразие функциональных задач, PyroMark Q24 является оптимальным решением для научных и клинических лабораторий с широким спектром задач, не требующих высокой пропускной способности. Пример автоматического учета результатов пиросеквенирования программным обеспечением PyroMark Q24 Software полиморфизма L33P T>C (rs5918) представлен на рис. 4.

Благодаря способности проводить быстрое автоматическое секвенирование большого количества образцов и возможности автоматической интерпретации результатов анализа, пиросеквенирование является оптимальным методом для определения однонуклеотидных замен в геноме человека. Дополнительные опции, такие как оценка аллельной встречаемости и анализ статуса метилирования, делают системы генетического анализа серии PyroMark универсальным инструментом, направленным на решение широкого спектра молекулярно-биологических задач для научных и клинических лабораторий.

На базе технологии пиросеквенирования сотрудниками ФГУН “Центральный НИИ эпидемиологии” разработаны наборы реагентов для детекции более 140 мутаций и генетических полиморфизмов, ассоциированных с часто встречающимися в клинической практике заболеваниями и синдромами (таблица). Выбранные генетические полиморфизмы, за редким ис-

**Профили генетических исследований, разработанные
для систем генетического анализа серии PyroMark “Пироскрин”**

| Профиль генетического исследования | Исследуемые гены | Полиморфизмы* |
|---|--|--|
| 1 | 2 | 3 |
| Артериальная гипертензия – “ТОНО-скрин” | ADRB2, AGT, AGTR1, NOS3 | rs1042713, rs4762, rs699, rs5186, rs1799983 |
| Ишемическая болезнь сердца – “ИБС-скрин” | AMPD1, APOE, CDKN2A/2B, HIF1A, MMP3 | rs17602729, rs1333049, rs11549465, rs3025058, rs429358, rs7412 |
| Липидный обмен, базовый профиль – “ЛИПО-Б-скрин” | APOB, APOE, PCSK9 | rs429358, rs7412, rs5742904, rs754523, rs11206510 |
| Липидный обмен, базовый профиль – “ЛИПО-Д-скрин” | ABCA1, APOC3, LPL, PON1 | rs2230806, rs2854116, rs2854117, rs5128, rs268, rs328, rs854560, rs662 |
| Плазменные факторы системы свертывания крови – “ПЛАЗМО-скрин” | F2, F5, F7, FGB, SERPINE1 | rs1799963, rs6025, rs6046, rs1800790, rs1799768 |
| Фолатный цикл – “ФОЛАТ-скрин” | MTHFR, MTR, MTRR, SLC19A1 | rs1801133, rs1801131, rs1805087, rs1801394, rs1051266 |
| Агрегационные факторы системы свертывания крови – “ТРОМБО-скрин” | GP1BA, ITGB3, JAK 2, SELPLG | rs2243093, rs6065, rs5918, rs77375493, rs2228315 |
| Рак молочной железы и яичников – “BRCA-скрин” | BRCA1, BRCA2 | 185delAG, 300T>G (C61G), 2080delA, 4153delA, 5382insC, 6174delT |
| Остеопороз – “ОСТЕО-скрин” | COL1A1, ESR1, LCT, LRP5, VDR | rs1800012, rs2234693, rs9340799, rs4988235, rs3736228, rs1544410 |
| Сахарный диабет 1-го типа – “ДИАБЕТ-1-скрин” | C12ORF30, CLEC16A, INS, PTPN22 | rs17696736, rs12708716, rs2544677, rs689, rs2476601 |
| Сахарный диабет 2-го типа, базовый профиль – “ДИАБЕТ-2-скрин” | KCNJ11, PPARG, TCF7L2 | rs5219, rs1801282, rs7903146, rs12255372 |
| Сахарный диабет 2-го типа, дополнительный профиль – “ДИАБЕТ-2Д-скрин” | CDKAL1, CDKN2A/B, HHEX, IGF2BP2, SLC30A8 | rs7756992, rs10811661, rs1111875, rs4402960, rs13266634 |
| Ожирение – “АДИПО-скрин” | FTO, PPARG, PPARGC1A, PPARGC1B | rs9939609, rs6902123, rs8192678, rs7732671 |
| Болезнь Крона – “КОЛО-скрин” | NOD2, NKX2-3, PTPN2 | rs2066844, rs2066845, rs10883365, rs2542151 |

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|--|
| I фаза биотрансформации “ФАРМА-скрин-1” | CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 | rs1048943, rs1799814, rs4646903, rs762551, rs2740574, rs1799853, rs1057910 |
| II фаза биотрансформации, про- филь 1 “ФАРМА-скрин-2а” | NAT2 | rs1041983, rs1801280, rs1799929, rs1799930, rs1208, rs1799931 |
| II фаза биотрансформации, про- филь 2 “ФАРМА-скрин-2б” | EPHX1, GSTP1, TPMT | rs1051740, rs2234922, rs1695, rs1138272, rs1800462, rs1800460, rs1142345 |
| Транспорт лекарств – “ФАРМАдинамика-скрин” | ABCB1, ABCG2 | rs1128503, rs2032582, rs1045642, rs2231142, rs72552713 |
| “ФАРМА-скрин-Варфарин” | VKORC1, CYP4F2, GGCX, CYP2C9 | rs9923231, rs2108622, rs11676382, rs1799853, rs1057910, rs28371686, rs9332131 |
| “ФАРМА-скрин-Иматиниб” | ULK3, VEGFR2, VEGFA | rs2290573, rs1531289, rs1870377, rs699947, rs833061, rs3025039, rs2010963 |
| “CCR5del32-скрин” | CCR5 | rs333 |
| “СПОРТ-мио-скрин” | ACTN3, MSTN, AGT, HIF1A | rs1815739, rs1805086, rs699, rs11549465 |
| “СПОРТ-энерго-скрин” | PPARA, PPARC1, PPARG, PPARGC1A, PPARGC1B, AMPD1 | rs4253778, rs2016520, rs1801282, rs8192678, rs7732671, rs17602729 |

* Представлены идентификационные номера однонуклеотидных полиморфизмов из базы данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>; для генов BRCA1, BRCA2 указаны обозначения мутаций.

ключением, объединены в группы – профили генетических исследований, направленных на выявление полиморфизмов, связанных с генетической предрасположенностью к развитию различных мультифакториальных заболеваний. Разработаны профили для оценки генетической предрасположенности к развитию следующих патологических состояний и синдромов: нарушений свертываемости крови, гипергомоцистеинемии, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, нарушений липидного обмена, сахарного диабета 1-го и 2-го типов, остеопороза, рака молочной железы и яичников, ожирения и метаболического синдрома. Также создана панель фармакогенетических тестов, включающая наиболее часто встречающиеся

однонуклеотидные полиморфизмы в генах ферментов, вовлеченных в процессы детоксикации ксенобиотиков и биотрансформации лекарственных средств, и две группы тестов для оценки индивидуальной предрасположенности к физической нагрузке.

Разработка профилей генетических исследований и фармакогенетических тестов проводилась с учетом опубликованных в научной литературе современных данных о результатах полногеномного скрининга ассоциаций полиморфных генетических локусов (GWAS), связанных с развитием основных мультифакториальных заболеваний. Дополнительная информация обо всех генетических полиморфизмах, включенных в разрабатываемые профили генетических исследований, доступна через базу данных однонуклеотидных полиморфизмов Национального центра биотехнологической информации. В настоящее время, в соответствии с публикуемыми научными данными, проводится работа по расширению спектра анализируемых генетических полиморфизмов и профилей генетических исследований, осуществляется создание систем, направленных на выявление соматических мутаций в опухолевых клетках и поиск мишеней в геноме человека, ассоциированных с восприимчивостью к некоторым инфекционным заболеваниям.

Список использованной литературы

1. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В.С. Баранова. СПб.: Издательство Н-Л, 2009. 528 с.
2. Клиническая фармакогенетика: учебное пособие / под ред. В.Г. Кукуца, Н.П. Бочкова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 248 с.
3. *Chen D.C., Saarela J., Nuotio I. et al. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping // J. Mol. Diagn. 2003. Vol. 5, N 4. P. 243–249.*
4. *Dunker J., Larsson U., Petersson D. et al. Parallel DNA template preparation using a vacuum filtration sample transfer device // Biotechniques. 2003. Vol. 34, N 4. P. 862–866, 868.*
5. *King C.R., Scott-Horton T. Pyrosequencing: a simple method for accurate genotyping // Methods Mol. Biol. 2007. Vol. 373. P. 39–56.*
6. *Ronaghi M., Uhlen M., Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate // Science. 1998. Vol. 17, N 281 (5375). P. 363–365.*
7. *Royo J.L., Galán J.J. Pyrosequencing for SNP genotyping // Methods Mol. Biol. 2009. Vol. 578. P. 123–133.*
8. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74, N 12. P. 5463–5467.*
9. *Tsiatis A.C., Norris-Kirby A., Rich R.G. et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications // J. Mol. Diagn. 2010. Vol. 12, N 4. P. 425–432.*
10. www.ncbi.nlm.nih.gov.
11. www.pyrosequencing.com.
12. www.qiagen.com.