

УДК: **616-074:078:575.22(476)**

Год издания: **2013**

Опыт применения технологии HRM для определения однонуклеотидных полиморфизмов в Беларуси

Серикова Е.В., Воропаев Е.В., Голубых Н.М., Баранов О.Ю.

Рубрики: 76.03.39, 76.35.33

Гомельский государственный медицинский университет

Тема НИР: «Молекулярно-генетические механизмы формирования предрасположенности и особенностей течения заболеваний желудочно-кишечного тракта, репродуктивной, сердечно-сосудистой и кроветворной систем»

Сроки выполнения НИР: 01.01.2011 г. — 31.12.2013 г.

Научный руководитель: канд. мед. наук Е.В. Воропаев

Источник финансирования: госбюджет.

Цель: апробация методики ПЦР в реальном времени с плавлением высокого разрешения для определения однонуклеотидных полиморфизмов.

Плавление с высоким разрешением (High Resolution Melts, HRM) — характеристика амплифицированных образцов ДНК в соответствии с их поведением при диссоциации цепей (плавлении). В процессе ПЦР с использованием пары праймеров происходит накопление ампликона. Далее осуществляется плавление продукта: двойная спираль переходит в одинарную с высвобождением интеркалирующего красителя и снижением уровня флуоресценции. Краситель специфически связывается с двуцепочечной ДНК и флуоресцирует. При отсутствии двуцепочечной ДНК красителю не с чем связываться, и флуоресценция происходит на низком уровне. В начале анализа HRM уровень флуоресценции высокий, т. к. в образце содержатся миллиарды копий ампликона. В процессе нагревания образца двуцепочечная ДНК постепенно плавится, ее количество уменьшается и таким образом флуоресценция снижается. Прибор отслеживает этот процесс путем измерения флуоресценции и выдает полученные данные в виде графика кривой плавления, отражающего уровень флуоресценции в зависимости от температуры плавления. Температура плавления ампликона зависит от последовательности оснований ДНК. При мутации в ДНК кривая плавления меняется. Эта разница может быть очень небольшой, в доли градуса.

Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов крови пациентов с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «Цитолизин» фирмы «Ампли-Сенс» (Россия).

В своей работе мы впервые в нашей стране использовали уникальный амплификатор Rotor Gene Q (Qiagen, Германия) — прибор, совмещающий в себе функции амплификатора ПЦР в реальном времени и инструмента для HRM.

Отработку методики HRM проводили на примере полиморфизма G460W гена β -аддуцина (ADD1), влияющего на эффективность применения диуретиков в терапии пациентов с сердечно-сосудистой патологией. Замена одного нуклеотида в гене ADD1 приводит к замене Gly на Trp в позиции 460 в молекуле белка (Gly460Trp полиморфизм) и вызывает изменения реабсорбции ионов в почечных канальцах.

По результатам HRM наши ампликоны отличались по пикам плавления. После визуальной оценки образцы были объединены в 3 группы:

- 1) образцы, имеющие один пик 83,425°C — это гомозиготы по дикому аллелю;
- 2) образцы, имеющие два пика плавления в районе 82,7 и 83,4°C — это гетерозиготы;
- 3) образцы, имеющие один пик 83,39°C — это гомозиготы по мутантному аллелю.

Также результаты HRM оценивались нами с помощью соответствующего программного обеспечения «ScreenClust». Программа автоматически разделила образцы на 3 кластера, которые полностью совпали с группами, полученными с помощью визуального анализа.

Для проверки результатов генотипирования полиморфизма G460W гена ADD1 с помощью HRM эти же образцы были типированы с помощью рестрикционного анализа.

Аmplифицируемый участок гена ADD1, содержащий нуклеотидную замену G460W, при инкубации с рестриктазой Van91I образует рестриктные фрагменты длиной 148+18 п.н. (аллель 460W) и/или 166 п.н. (аллель 460G). Для рестрикции было отобрано по 4 мкл ампликонов, инкубацию проводили при температуре 37°C в течение 16 ч. Электрофоретическое фракционирование рестриктов проводили в агарозном геле по стандартной методике.

Результаты рестрикционного анализа полностью совпали с результатами HRM, полученными вручную и с помощью программы «ScreenClust».

Таким образом, впервые в Беларуси была освоена технология HRM для определения однонуклеотидных полиморфизмов. Поскольку метод HRM является более быстрым и менее трудозатратным по сравнению с рестрикционным анализом, а результаты обоих методов совпали, для анализа полиморфизмов различных генов можно применять методику HRM. Для оценки результатов HRM можно использовать программу «ScreenClust».

Область применения: медицинская генетика, лабораторное дело.

Рекомендации по использованию: 1) определение однонуклеотидных полиморфизмов — распознавание аллелей (выявление возможных генов предрасположенности к заболеванию; ассоциативные исследования, например, сравнение случай-контроль, генотип-фенотип; оценка распространенности в популяции или различных группах; выявление потери гетерозиготности; идентификация ДНК; определение гаплотипов; 2) выявление врожденных и приобретенных мутаций — скрининг; 3) предикативные исследования — исследования пенетрантности/сцепленности — прослеживание заболевания в пределах семьи; 4) идентификация видов; 5) HLA-совместимость; 6) оценка эпигенетического метилирования.

Предложения по сотрудничеству: консультативная помощь при внедрении, совместные исследования по указанной тематике.