

УДК: **616-074:575.22**

Год издания: **2012**

Рестрикционный анализ и секвенирование полиморфного участка G1934A гена CYP2D6

Серикова Е.В., Воропаев Е.В., Осипкина О.В., Баранов О.Ю.

Рубрики: 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: выбор наиболее оптимального метода для изучения связи полиморфизма G1934A гена CYP2D6 с ответом на терапию β -адреноблокаторами.

β -адреноблокаторы прочно вошли в практику кардиолога как высокоэффективные лекарственные средства для лечения всех форм ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, хронической сердечной недостаточности. Однако ответная реакция на β -адреноблокаторы характеризуется значительной индивидуальной вариабельностью. Непосредственно на фармакодинамику β -адреноблокаторов могут влиять изменения в генах, отвечающих за синтез молекул-мишеней для этой группы лекарственных средств — β_1 -адренорецепторов. Функционально дефектный аллельный вариант G1934A гена CYP2D6 проявляет себя синтезом неактивного белка.

В качестве материала для исследований использовалась ДНК, выделенная из лейкоцитов крови пациентов, с использованием комплектов реагентов для выделения ДНК из клинического материала «Цитолизин» фирмы «АмплиСенс» (Россия). Последовательность используемых праймеров: 5'-GCCTTCGCCAACCCTCCG-3'; 5'-AAATCCTGCTCTCCGAGGC-3'. Амплификацию проводили на амплификаторе «PalmCycler» фирмы Corbett Research (Австралия), используя реагенты фирмы «Fermentas» (Литва). Для подбора температуры отжига праймеров полиморфизма гена CYP2D6 использовали следующий градиент температур 50; 54; 60; 66 и 70°C. По результатам электрофореграмм было видно, что повышение температуры отжига уменьшает число неспецифических продуктов реакции, но при самой высокой температуре градиента реакция вообще не идет. Таким образом, в качестве оптимальной температуры отжига выбрали 66°C.

Электрофоретическое фракционирование ампликонов проводили в 1,7% агарозном геле по стандартной схеме с окраской раствором бромистого этидия. Анализ электрофоретических спектров проводился с помощью программного обеспечения «Quantity One» (Biorad).

Для приготовления рестрикционной смеси использовали реагенты фирмы «Fermentas» (Литва). Для проведения рестрикции было отобрано по 6 мкл ампликонов, инкубацию проводили при температуре 37°C в течение 16 ч. Электрофоретическое фракционирование рестриктов проводили в агарозном геле по стандартной методике. Амплифицируемый участок гена CYP2D6, содержащий нуклеотидную замену G1934A при инкубации с рестриктазой MvaI образует рестриктные фрагменты длиной 105+249 (аллель G), 354 (аллель A).

Кроме того, мы провели анализ генетической структуры ДНК полиморфного участка G1934A гена CYP2D6 этих же образцов с помощью метода автоматического секвенирования с использованием полученных ампликонов. Для очистки ампликонов использовали набор «GeneJet PCR Purification Kit» производства компании «Fermentas» (Литва).

Для секвенирования использовали метод терминации цепи, или метод Сэнжэра. В ходе исследований была использована реакционная смесь с использованием BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit. После проведения секвенирующей реакции проводили очистку продуктов от непрореагировавших дидезоксинуклеотидтрифосфатов, дезоксинуклеотидтрифосфатов, праймеров.

Электрофоретическое разделение флюоресцентномеченых продуктов секвенирующей реакции проводили с помощью генетического анализатора ABI PRISM 310 фирмы «Applied Biosystems» (USA). Идентификация образцов была проведена с помощью программы BLAST в базе данных NCBI на основании анализа полученных нуклеотидных последовательностей для каждого из образцов. Было проведено сравнение изучаемых нами образцов.

Результаты обоих методов полностью совпали. Однако, поскольку метод автоматического секвенирования является более дорогим и трудозатратным по сравнению с рестрикционным анализом, для анализа полиморфного участка G1934A гена CYP2D6 целесообразно применять рестрикционный анализ.

Область применения: определение однонуклеотидных полиморфизмов.

Рекомендации по использованию: для определения наследственной предрасположенности к заболеваниям, генетически обусловленной индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам.

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