

УДК 577.2

©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ГЕМОСТАЗА И ФОЛАТНОГО ЦИКЛА НА ОСНОВЕ МИКРОЧИПОВОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

К.В. Богданов^{1,3}, М.М. Никитин^{2,3}, М.Н. Сляднев^{2,3}*

¹НИИ Гематологии, Федеральный медицинский исследовательский центр
имени В.А. Алмазова, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2;
эл. почта: kvbogdanov@yandex.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
³Группа компаний “Люмэкс”, Санкт-Петербург

Генная диагностика широко используется для выявления факторов риска развития наследственной тромбофилии, возникающей вследствие молекулярных дефектов в системе свертывания крови. Частым генетическим изменением, обуславливающим развитие наследственной тромбофилии, является полиморфизм генов гемостаза (F2 20210G>A, F5 1691G>A) и фолатного цикла (MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C). Риск развития тромбозов значительно возрастает, если мутации в генах F2 и/или MTHFR встречаются в сочетании с мутацией Лейдена (F5 1691G>A). Таким образом, выполнение анализа с целью определения аллельного полиморфизма одновременно всех названных генов имеет важное клиническое значение. В настоящем исследовании показана высокая эффективность метода для оценки аллельного полиморфизма генов гемостаза и фолатного цикла с использованием микрочиповой аллель-специфичной ПЦР. Этот тест позволяет одновременно проанализировать полиморфизм по трём генам (четырёх точкам мутации) за короткое время с использованием минимального количества ДНК-матрицы и реактивов ПЦР, включая ДНК полимеразу, и может быть рекомендован для клинической лабораторной диагностики.

Ключевые слова: тромбофилия, полиморфизм, F2, F5, MTHFR, ПЦР, микрочипы.

DOI: 10.18097/PBMC20156103357

ВВЕДЕНИЕ

В течение последнего десятилетия большое внимание уделяется проблеме наследственной тромбофилии, которая приводит к нарушениям в системе свёртывания крови. Такие изменения, как правило, способствуют повышенному риску развития сердечно-сосудистых заболеваний, включая инфаркт миокарда и гипертоническую болезнь, а также возникновению ряда осложнений при беременности, сопровождающихся внутриутробной гибелью плода и др. [1, 2]. Известно, что около 35-40% взрослого населения страдает разными формами тромбофилии, которые могут приводить к различным патологиям. Особенно показательна вовлечённость тромбофилии в патологию беременности, где она составляет 40-80% [2]. К настоящему времени обнаружены дефекты во многих генах, которые могут приводить к нарушениям в системе свертывания крови. Среди них немаловажное значение имеют мутации

в генах фактора свертывания V (F5 1691G>A/rs6025), протромбина (F2 20210G>A/rs1799963) и гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR 677C>T/rs1801133 и MTHFR 1298A>C/rs1801131). Частота встречаемости мутаций в этих генах и их функциональная значимость представлены в таблице 1. Для определения точечных мутаций (single nucleotide polymorphism, SNP) используются разные методы: анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), аллель-специфичная ПЦР, ПЦР-гибридизация с построением кривых плавления, биочиповый тест на основе ПЦР и дот-блот гибридации, прямое секвенирование, а также масс-спектрометрия (MALDI-TOF). Последний из перечисленных методов, используемый для выявления точечных мутаций, обладает высокой чувствительностью и подходит для мультиплексного анализа SNP. Недавно появился новый метод полногеномного секвенирования – NGS (от англ. Next Generation Sequencing), позволяющий определять дефекты в целом геноме

* - адресат для переписки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ НА ОСНОВЕ МИКРОЧИПОВОЙ ПЦР

Таблица 1. Частота встречаемости и функциональная значимость полиморфизма генов гемостаза (F2, F5) и фолатного цикла (MTHFR).

Ген, название	Полиморфизм	Частота встречаемости в европейской популяции	Функциональная значимость
F2, фактор свёртывания, протромбин (фактор II)	20210G>A	гетерозигота: 2-3%	способствует возникновению тромбозов, часто встречается в сочетании с мутацией Лейдена; повышает в 5 раз риск развития инфаркта миокарда у пациентов моложе 51 года [4, 5]
F5, фактор свёртывания, фактор Лейдена (фактор V)	1691G>A	гетерозигота: 2-6%	повышает риск возникновения тромбозов, развития инфаркта миокарда и вероятность развития осложнений беременности [4, 6]
MTHFR, метилентетрагидро-фолатредуктаза, ключевой фермент метаболизма фолиевой кислоты	677C>T	гетерозигота: 40-56%, гомозигота: 5-13%	повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и вероятность развития осложнений беременности [7, 8]
	1298A>C	гетерозигота: 40-50%, гомозигота: 5-10%	в сочетании с мутацией Лейдена повышает риск возникновения венозных тромбозов и вероятность невынашивания беременности [8]

человека, но как и масс-спектрометрия, он довольно дорог [9]. Методы определения точечных мутаций на основе дот-блот гибридизации позволяют одновременно анализировать полиморфизм по нескольким генам в исследуемом материале [10]. Однако, такие методы многоступенчаты, занимают много времени и/или недостаточно специфичны. Недавно появились методы оценки полиморфизма генов с использованием ПЦР на микрочиповых анализаторах [11]. Их отличают: высокая специфичность, возможность выполнения 100 или 1000 реакций в объеме реакционной смеси 6-30 нл, высокая производительность и автоматизация. Вместе с тем, для использования такого метода требуются узкоспециализированные микрочипы; к тому же, полная загрузка широко-специализированных микрочипов возможна только в крупных исследовательских центрах, а сам анализ занимает много времени.

Таким образом, целью настоящего исследования была разработка методики, подходящей для оценки полиморфизма одновременно нескольких генов в условиях любой клинической лаборатории с использованием микрочипов и мультиплексной аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени. В настоящем исследовании было показано, что разработанный метод ПЦР на микрочипах позволяет эффективно оценивать полиморфизм генов F2 20210G>A, F5 1691G>A и MTHFR (677C>T, 1298A>C) в течение короткого времени с использованием минимального количества ДНК-матрицы. Упрощённая постановка ПЦР требует внесения ДНК-матрицы вместе с ПЦР буфером в ячейки микрочипа и выполнение аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени в течение 40 мин.

МЕТОДИКА

Подготовка пробы (экстракция ДНК)

Пробоподготовку выполняли из 200 мкл периферической крови больных и здоровых

доноров с использованием коммерческого набора реагентов “Сорб-В” (“ИнтерЛабСервис”, Россия), предназначенного для выделения ДНК на сорбенте. Образец ДНК элюировали в 100 мкл 1x ТЕ буфера и хранили при +4°C. Все пациенты и доноры были проинформированы о проводимом исследовании и добровольно согласились предоставить свой биоматериал для анализа.

Подбор специфичных праймеров и зондов

Подбор специфичных праймеров и зондов для оценки полиморфизма генов гемостаза F2 20210G>A, F5 1691G>A и фолатного цикла MTHFR 677C>T (1298A>C) был выполнен на основе анализа базы данных NCBI. Информация о нуклеотидных последовательностях представлена в таблице 2. Специфичность подобранных праймеров и зондов, а также чувствительность аллель-специфичной ПЦР была подтверждена с использованием просеквенированных контрольных образцов ДНК, полученных от больных, носителей мутаций исследуемых генов. Такие контрольные образцы ДНК были любезно предоставлены лабораторией пренатальной диагностики наследственных и врождённых заболеваний НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН (Санкт-Петербург). В дальнейшем для выполнения клинических испытаний в качестве позитивных контрольных образцов ПЦР использовали коммерческие синтезированные плазмидные ДНК, несущие все варианты исследуемого полиморфизма (“Сервис-Ген”, Россия).

Подготовка микрочипов

Лиофилизирование микрочипов (одноразовых) с предварительно нанесённым носителем, включавшим 2X лиофильный раствор [3], 2,5 мМ каждого dNTP, 9,6 пМ каждого праймера, 6 пМ каждого зонда и 5 ед. Taq полимеразы (“Евроген”, Россия) выполняли в течение 60 мин в вакуумном эксикаторе при -4°C и атмосферном давлении ≤500 Па.

Мультиплексная аллель-специфичная ПЦР в режиме реального времени

При подготовке пробы для ПЦР 1 мкл исследуемого образца (ДНК) смешивали с 9 мкл 1х ПЦР буфера. Отрицательный контрольный образец вместо ДНК содержал деионизированную воду. Положительный контрольный образец содержал 1 мкл контрольной ДНК (wt/wt, wt/mut, mut/mut). Приготовленные пробы и контрольные образцы вносили последовательно в соответствующие ячейки микрочипа в объёме 1,2 мкл под слой герметизирующей жидкости [3]. Термоциклирование проводили на амплификаторе AriaDNA (“Люмэкс”, Россия) в режиме реального времени, включая начальную денатурацию при 94°C – 120 с и последующие 45 циклов: 94°C – 3 с, 60°C – 25 с. Анализ результатов аллель-специфичной ПЦР выполняли с помощью прилагаемого программного обеспечения. Разницу между средними значениями пороговых циклов оценивали по формуле: $\Delta C_t = C_{t1} - C_{t2}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед разработкой тест-системы для определения вариантов полиморфизма генов F2 20210G>A, F5 1691G>A, MTHFR 677C>T (1298A>C) и применения лиофилизированных микрочипов в ПЦР, проводили оптимизацию аллель-специфичной амплификации на микрочипах с использованием жидких реактивов, согласно протоколу, опубликованному ранее [12]. Следует отметить, что в каждой ячейке микрочипа присутствовали оба праймера (прямой и обратный), а также пара зондов, меченных разными флуоресцентными красителями: FAM для дикого типа /wt/ и ROX для мутации /mut/ (табл. 2). В настоящем исследовании было показано, что тест-система для оценки полиморфизма с использованием жидких реактивов ПЦР и контрольных просеквенированных образцов ДНК является специфичной и обладает достаточной способностью различать все варианты полиморфизма исследуемых генов. На рисунке 1 представлен шаблон, описывающий порядок внесения контрольных образцов и ДНК доноров в ячейки микрочипа для выполнения аллель-специфичной ПЦР.

При подготовке микрочипов с лиофилизированным носителем и выполнении ПЦР, условия амплификации считали оптимальными, если чувствительность и специфичность анализа для оценки генетических полиморфизмов с использованием лиофилизированных микрочипов не отличалась от результатов ПЦР на микрочипах с жидким носителем. Согласно полученным результатам, минимальная чувствительность аллель-специфичной ПЦР при использовании лиофилизированных микрочипов составила 1 нг ДНК на 1 мкл исследуемого материала, что соответствовало среднему значению порогового цикла 29,7±0,4 (рис. 2).

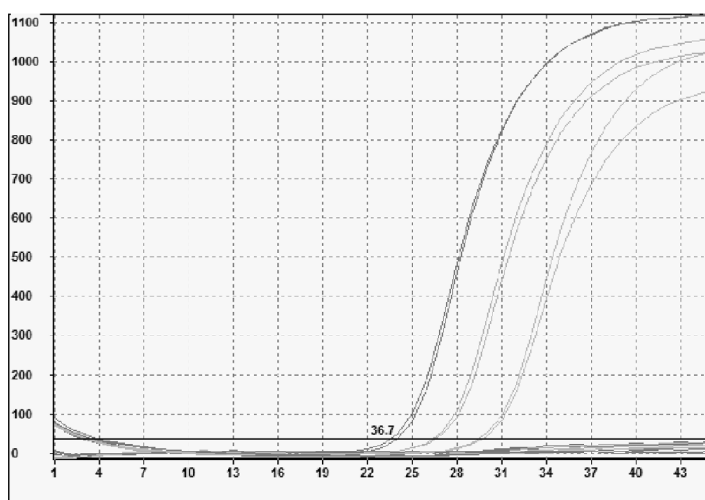
Таблица 2. Праймеры и зонды для определения полиморфизма генов гемостаза (F2 20210G>A; F5 1691G>A) и фолатного цикла (MTHFR 677C>T; MTHFR 1298A>C).

Название	Последовательность 5'-3'
F2/20210-F	TGGAACCAATCCCGTGAAA
F2/20210-R	GCTGCCCATGAATAGCACT
F5/1691-F	CCCAGTGCTTAACAAGACCA
F5/1691-R	TCTGAAAGGTTACTTCAAGGACAAA
MTHFR/677-F	CTGAAGCACTTGAAGGAGAAG
MTHFR/677-R	CCTCAAAGAAAAGCTGCGTG
MTHFR/1298-F	AGGAGCTGCTGAAGATGTG
MTHFR/1298-R	GTTCTCCCGAGAGGTAAGA
F2/20210-WT	FAM-gactctcagcGagcctcaat-BHQ1
F2/20210-MUT	ROX-gactctcagcAagcctcaatg-BHQ2
F5/1691-WT	FAM-cctggacaggcGaggaat-BHQ1 примечание: G включает LNA модификацию
F5/1691-MUT	ROX-ccctggacaggcAaggaat-BHQ2
MTHFR/677-WT	FAM-gaaatcgGctccgcaga-BHQ1
MTHFR/677-MUT	ROX-tgaaatcgActccgcaga-BHQ2
MTHFR/1298-WT	FAM-caaagacactTcttctggtca-BHQ1
MTHFR/1298-MUT	ROX-caaagacactGcttctggtc-BHQ2

F2	F2 N/N	F5	F5 N/N	677	677 N/N
F2	F2 N/M	F5	F5 N/M	677	677 N/M
F2	F2 M/M	F5	F5 M/M	677	677 M/M
1298	1298	1298	1298 N/N	1298 N/M	1298 M/M
		К-	К-	К-	К-

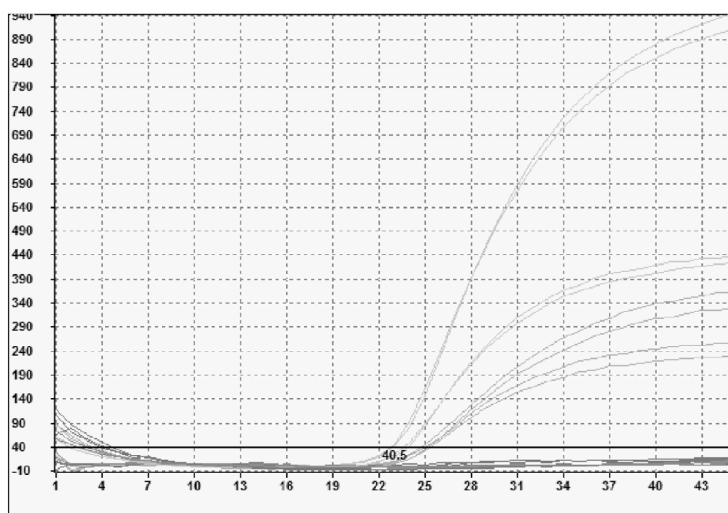
Рисунок 1. Расположение ячеек микрочипа для оценки полиморфизма генов с использованием аллель-специфичной ПЦР.

Высокая эффективность тест-системы с использованием лиофилизированных микрочипов в ПЦР была подтверждена и во время проведения клинических испытаний. Для этого периферическая кровь доноров (n=100) была тестирована для выявления полиморфизма изучаемых генов с помощью ПЦР. Пример оценки полиморфизма всех трёх генов (четырёх вариантов полиморфизма) у одного из исследуемых доноров на лиофилизированном микрочипе представлен на рисунке 3. Согласно результатам ПЦР, у этого донора был выявлен



Количество во ДНК (мг/мг)	Канал детекции	Пороговый цикл ср. Ct	Разница между циклами ΔCt	Полиморфизм
100	wt	0	-23,8	гомозигота, мутация MTHFR 677T/T
	mut	23,8 ±0,5		
10	wt	0	-26,5	
	mut	26,5 ±0,3		
1	wt	0	-29,7	
	mut	29,7 ±0,4		

Рисунок 2. Определение минимальной чувствительности аллель-специфичной ПЦР для оценки полиморфизма гена MTHFR 677C>T.



Ген	Канал детекции	Пороговый цикл ср. Ct	Разница между циклами ΔC_t	Полиморфизм
MTHFR 677C>T	wt	23,7 $\pm 0,1$	-	дикий тип 677CC
	mut	0		
MTHFR 1298A>C	wt	25,0 $\pm 0,3$	-0,6	мутация, гетерозигота 1298AC
	mut	25,6 $\pm 0,2$		
F2 20210G>A	wt	22,9 $\pm 0,2$	-1,1	мутация, гетерозигота 20210GA
	mut	24,0 $\pm 0,2$		
F5 1691G>A	wt	24,1 $\pm 0,0$	-	дикий тип 1691GG
	mut	0		

Рисунок 3. Результаты аллель-специфичной ПЦР для оценки полиморфизма генов F2, F5 и MTHFR.

следующий полиморфизм: гетерозиготная мутация F2 20210G/A ($\Delta C_t = -1,1$), гомозигота дикого типа F5 1691G/G, гетерозиготная мутация MTHFR 1298A/C ($\Delta C_t = -0,6$) и гомозигота дикого типа MTHFR 677C/C. Частота встречаемости генетического полиморфизма у всех обследованных в настоящем исследовании доноров в целом не отличалась от литературных данных (табл. 3). Необходимо отметить, что эффективность разработанной тест-системы с использованием лиофилизированных микрочипов в ПЦР для оценки изучаемого полиморфизма генов была подтверждена методом прямого секвенирования образцов ДНК, случайно выбранных из исследуемой популяции.

Таким образом, выполнение анализа с целью определения аллельного полиморфизма одновременно всех названных генов имеет важное клиническое значение и является необходимым для оценки риска развития разных заболеваний. Например, риск развития сердечно-сосудистых заболеваний значительно возрастает, если мутации в генах

F2 и/или MTHFR встречаются в сочетании с мутацией Лейдена (F5 1691G>A) [13, 14]. Кроме того, сочетание гомозиготного аллеля MTHFR 677TT и гена протромбина F2 20210G>A повышает риск развития тетраплегии у новорождённых [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В настоящее время существует несколько разных способов оценки полиморфизма генов; однако, их применение в клинической диагностике не всегда возможно, из-за трудоёмкости или продолжительности методик, а также из-за сложностей, возникающих при трактовке результатов анализа. Например, метод ПЦР с последующей дот-блот гибридизацией может приводить к появлению ложноположительных результатов из-за повышения общего фонового уровня после отмывки блотов от несвязанных компонентов [16]. С другой стороны, ПЦР-гибридизация в режиме реального

Таблица 3. Частота встречаемости полиморфизма генов гемостаза (F2, F5) и фолатного цикла (MTHFR) обнаруженная в настоящем исследовании.

Ген, название	Полиморфизм	Частота встречаемости полиморфизма
F2	20210G>A	гетерозигота: 4%
F5	1691G>A	гетерозигота: 3%
MTHFR	677C>T	гетерозигота: 54%, гомозигота: 5%
	1298A>C	гетерозигота: 43%, гомозигота: 12%
MTHFR	MTHFR 677CT + MTHFR 1298AC	комбинированный: 9%
F2, F5, MTHFR	F5 1691GA + MTHFR 677CC + MTHFR 1298AC	комбинированный: 1,5%
	F2 20210GA + MTHFR 1298AC	комбинированный: 1,5%
	F2 20210GA + MTHFR 677CT	комбинированный: 1,5%
	F5 1691G/A + MTHFR 1298AC	комбинированный: 1,5%

времени с последующим построением кривых плавления не всегда позволяет идентифицировать варианты гетерозиготного полиморфизма, что может быть связано с особенностями нуклеотидной структуры ампликона [17].

По сравнению с двумя вышеуказанными способами оценки генетического полиморфизма, метод аллель-специфичной мультиплексной ПЦР с использованием микрочипов имеет ряд преимуществ. Во-первых, амплификация ДНК для всех трёх генов (четырёх точек мутации) выполняется с использованием лиофилизированных микрочипов в режиме реального времени и занимает не более 40 мин, включая анализ результатов с помощью программного обеспечения. Во-вторых, благодаря упрощённой постановке ПЦР требуется только смешать исследуемую ДНК с ПЦР буфером, внести пробы и контрольные образцы в соответствующие ячейки микрочипа и запустить амплификацию. В-третьих, для анализа требуется минимальное количество реактивов ПЦР, включая Taq полимеразу и минимальное количество ДНК-матрицы.

Таким образом, разработанный метод мультиплексной ПЦР с использованием микрочипов, позволяет с высокой точностью определять аллельный полиморфизм генов гемостаза и фолатного цикла, и может быть рекомендован для применения в клинической лабораторной диагностике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Комаров А.Л., Шахматова О.О., Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю., Коткина Т.И., Илющенко Т.А. (2011) Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии, **7**, 409-425.
2. Макацария А.Д., Бицадзе В.О. (2003) Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике, Триада-Х, М., 496с.
3. Наволоцкий Д.В., Перчик А.В., Маркьянов И.А., Ганеев А.А., Сляднев М.Н. (2011) Прикл. биохим. микробиол., **47**, 241-248.
4. Lane D.A., Grant P.J. (2000) Blood, **95**, 1517-1532.
5. Van de Water N.S., French J.K., Lund M., Hyde T.A., White H.D., Browett P.J. (2000) J. Am. Coll. Cardiol., **36**, 717-722.
6. Ridker P.M., Miletich J.P., Buring J.E., Ariyo A.A., Price D.T., Manson J.E., Hill J.A. (1998) Ann. Intern. Med., **128**, 1000-1003.
7. Kluijtmans L.A., van den Heuvel L.P., Boers G.H., Frosst P., Stevens E.M., van Oost B.A., den Heijer M., Trijbels F.J., Rozen R., Blom H.J. (1996) Am. J. Hum. Genet., **58**, 35-41.
8. Grandone E., Margaglione M., Colaizzo D., D'Andrea G., Cappucci G., Brancaccio V., Di Minno G. (1998) Am. J. Obstet. Gynecol., **179**, 1324-1328.
9. Lotta L.A., Wang M., Yu J., Passamonti S.M. (2012) BMC Med Genomics, **5**, DOI:10.1186/1755-8794-5-7.
10. Maggio A., Giambona A., Cai S.P., Wall J., Kan Y.W., Chehab F.F. (1993) Blood, **81**, 239-242.
11. Wang J., Lin M., Crenshaw A., Hutchinson A., Hicks B., Yeager M. (2009) BMC Genomics, **10**, DOI: 10.1186/1471-2164-10-561.
12. Edwards K.J. (2004) in: Performing Real-Time PCR. In Real-Time PCR: An Essential Guide (Edwards K., Logan J., Saunders N., eds.), Horizon Bioscience, Norfolk, pp. 71-83.
13. Bauduer F., Lacombe D. (2005) Mol. Genet. Metab., **86**, 91-99.
14. Mansilha A., Araújo F., Severo M., Sampaio S.M., Toledo T., Albuquerque R. (2006) Phlebology, **21**, 24-27.
15. Gibson C.S., MacLennan A.H., Hague W.M., Haan E.A., Priest K., Chan A., Dekker G. A., Goldwater, P. N. (2005) Am. J. Obstet. Gynecol., **193**, 1437-1443.
16. Seipp M.T., Pattison D., Durtschi J.D., Jama M., Voelkerding K.V., Wittwer C.T. (2008) Clin. Chem., **54**, 108-115.
17. Montgomery J., Wittwer C.T., Kent J.O., Zhou L. (2007) Clin. Chem., **53**, 1891-1898.

Поступила: 02. 04. 2014.

ALLELE POLYMORPHISM ANALYSIS IN COAGULATION FACTORS F2, F5 AND FOLATE METABOLISM GENE MTHFR BY USING MICROCHIP-BASED MULTIPLEX REAL TIME PCR

K.V. Bogdanov^{1,3}, M.M. Nikitin^{2,3}, M.N. Slyadnev^{2,3}

¹Institute of Hematology, V.A. Almazov Federal Medical Research Centre,
2 Akkuratov str., St. Petersburg, 197341 Russia; e-mail: kvbogdanov@yandex.ru

²St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

³Lumex Group, St. Petersburg, Russia

Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping methods are widely used for the detection of hereditary thrombophilias caused by genetic defects in the coagulation system. The hereditary thrombophilias are frequently associated with higher incidences of point mutations in hemostasis (F2 20210G>A, F5 1691G>A) and folate metabolism (MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C) genes. Moreover, the combination of gene abnormalities in F2 or/and MTHFR with F5 Leiden mutation leads to increased risk of developing thrombosis. Thus, simultaneous detection of the multiple gene mutations in a sample has important clinical relevance. The microchip-based multiplex real time PCR for estimation of allele specific polymorphism in hemostatic and folate metabolism genes presented here has a high efficiency and may be used for laboratory diagnosis. The optimized protocol for estimation of 4 different types of genetic polymorphisms allowed PCR to be performed with minimal quantity of DNA template and PCR reagents including Taq polymerase and a short-term thermocycling.

Key words: hereditary thrombophilias, single nucleotide polymorphism, F2, F5, MTHFR, PCR.