Определение нуклеотидных полиморфизмов с помощью систем генетического анализа, основанных на пиросеквенировании

К.О. Миронов, Е.А. Дунаева, О.П. Дрибноходова, Г.А. Шипулин
ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

Исследования по полногеномному скринингу ассоциаций (Genome-WideAssociationStudy) в ряде случаев позволяют выявить однонуклеотидные полиморфизмы (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) в геноме человека, связанные или ассоциированные с различными состояниями, и, в том числе, с некоторыми заболеваниями. На сегодняшний день известно несколько сотен генетических локусов, большинство из которых представлены однонуклеотидными полиморфизмами, для которых показана ассоциация с развитием частых соматических заболеваний и патологических синдромов. Данные о связи «полиморфизм-заболевание» доступны через функционирующие биоинформационные Интернет-ресурсы. Удобным биоинформационным ресурсом, предназначенным, в том числе, для сбора, поиска и анализа информации об описанных генетических полиморфизмах и их ассоциациях с заболеваниями, является портал Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health USA) – http://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Ресурс содержит базы данных о заболеваниях «OMIM» (OnlineMendelian или InheritanceinMan) и генетических полиморфизмах («SNP»), и постоянно обновляемую базу данных научных публикаций «PubMed». Каждый однонуклеотидный полиморфизм имеет свой идентификационный номер (rs-обозначение), который позволяет однозначным образом сопоставлять данные о том или ином полиморфизме, полученные в независимых исследованиях, а также проводить поиск информации в публикациях и других базах данных.

Большинство социально-значимых болезней, таких как ишемическая болезнь сердца, онкологические заболевания, сахарный диабет 2 типа и других, возникают под влияниемнаследственных и средовых факторов. В качестве наследственных факторов можно рассматривать полиморфизмы в генах, продукты которых вовлечены в физиологические процессы, или полиморфизмы, для которых в популяционных исследованиях показана ассоциация с тем или иным заболеванием.

Другим клиническим приложением детекции генетических полиморфизмов являются фармакогенетические исследования – изучение генетических факторов, обуславливающих индивидуальные фармакологические реакции различных лекарственных препаратов или их сочетаний. Описаны клинические проявления полиморфизмов в генах, вовлеченных в процессы транспорта и метаболизма лекарственных препаратов, а также в генах, кодирующих молекулы-мишени, влияющие на эффективность и безопасность применения многих лекарственных средств. Выявление данных полиморфизмов позволяет прогнозировать ответ организма на лекарственное средство, и, следовательно, индивидуально подходить к выбору терапии, что повышает эффективность и безопасность фармакотерапии. Для некоторых препаратов разработаны алгоритмы и рекомендации клинического применения в зависимости от генетических особенностей пациента. Разработаны on-line ресурсы для интерпретации результатов некоторых фармакогенетических тестов (например, www.warfarindosing.org/ и http://nat2pred.rit.albany.edu/).

В связи с этим, генетический анализ однонуклеотидных полиморфизмов, обуславливающих риск возникновения заболевания или нежелательного фармакологического ответа, может быть использован в клинической практике для выявления лиц, имеющих генетическую предрасположенность к тому или иному заболеванию, а также для адекватного назначения лекарственной терапиис учетом индивидуальных фармакогенетических особенностей. Раннее выявление пациентов, наиболее подверженных риску заболевания, на вероятность возникновения которого оказывают влияние как генетические, так и средовые, т.е. модифицируемые, факторы, позволяет в ряде случаев планировать проведение профилактических мероприятий на досимптоматическом этапе.

Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов генома используется широкий спектр молекулярно-биологических методов, основанных на ПЦР. К наиболее распространенным методам можно отнести анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, аллель-специфическую ПЦР, различные варианты ПЦР в режиме реального времени, гибридизацию с использованием ДНК-чипов, масс-спектрометрический анализ и методы секвенирования ДНК. Различные варианты перечисленных методов используются в научных и клинических лабораториях, на рынке представлены наборы реагентов для детекции некоторых клинически значимых полиморфизмов. В то же время из всех перечисленных методов только секвенирование является прямым методом определения нуклеотидной последовательности, что позволяет однозначно интерпретировать полученный результат – нуклеотидную последовательность в области полиморфизма и нуклеотидный полиморфизм в гомо- или гетерозиготном состоянии.

Существует множество подходов для определения нуклеотидной последовательности, из которых в настоящее время наиболее распространенными в практике клинических и научных лабораторий являются: секвенирование с использованием флуоресцентномеченых дидезоксинуклеотидов с последующим анализом методом капиллярного электрофореза (секвенирование методом Сэнгера), пиросеквенирование, группа методов секвенирования «нового поколения» (next generation sequencing). Основные отличия методов проявляются в длине определяемых последовательностей и в пропускной способности оборудования, используемого для генетического анализа. Удобными и высокопроизводительными платформами, специально разработанными для определения однонуклеотидных полиморфизмов с помощью пиросеквенирования, являются системы генетического анализа серии «PyroMark» («Qiagen»).

Пиросеквенирование

Принцип метода пиросеквенирования, также обозначаемого как пиросеквенирующий синтез или секвенирование путем синтеза, был разработан в 1996 г. Полом Нироном (Pal Nyren) в Королевском техническом институте (Стокгольм, Швеция).

В основе метода – детекция пирофосфата, который высвобождается при синтезе двухцепочечной ДНК на матрице одноцепочечной ДНК. В качестве затравки для синтеза ДНК в реакции участвует праймер для секвенирования, комплементарный области, в которой находится детектируемый полиморфизм. После образования дуплекса «ДНК – праймер для секвенирования» в реакционную смесь добавляются нуклеотиды в последовательности, соответствующей последовательности секвенируемого генетического локуса. В случае, если нуклеотид комплементарен последовательности, при его встраивании во вновь синтезируемую цепь ДНК происходит высвобождение пирофосфата. В результате ферментативных реакций с участием пирофосфата регистрируется хемилюминесцентный сигнал. Невстроенные нуклеотиды разрушаются присутствующей в реакционной смеси апиразой. Последовательному добавлению нуклеотидов будет соответствовать график (пирограмма), на котором по горизонтальной оси будут отмечаться нуклеотиды, добавляемые в реакционную смесь, а по вертикальной оси – уровень хемилюминесцентного сигнала, причем уровень сигнала пропорционален количеству встроенных в цепь ДНК нуклеотидов. В зависимости от направления секвенирования – ориентации праймера для секвенирования – различают прямой (foward) иобратный (reverse) типы анализа.

Пример пирограммы представлен на рисунке 1. Для секвенирования области полиморфизма 2677G>T/A генаABCB1 (rs2032582) задается последовательность GA/C/TACCTTCT (полиморфные нуклеотиды разделены знаком «/»), для которой программное обеспечение прибора задает следующий порядок добавления нуклеотидов в реакционную смесь: CGCTACTCT. На графике область полиморфизма выделена цветом. Первый нуклеотид (C) отсутствует в нуклеотидной последовательности, которая секвенируется, поэтому он не встраивается в синтезируемую цепь ДНК и пирофосфат не детектируется: уровень сигнала равен нулю. Референсные нуклеотиды, присутст-

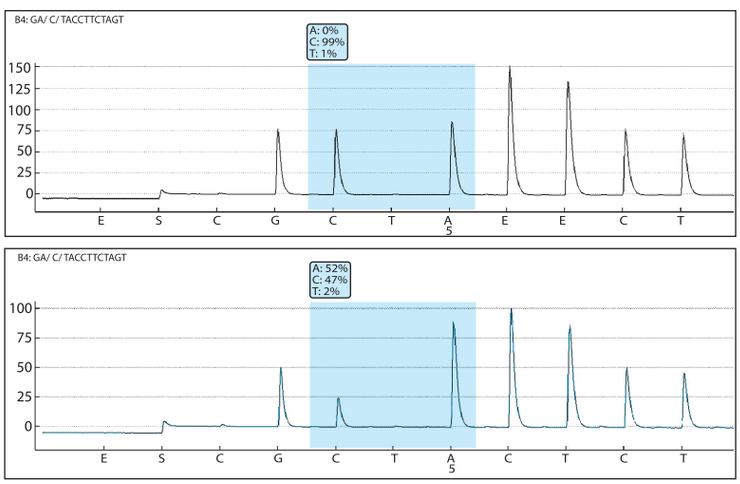

Рисунок 1.

Пример детекции полиморфизма 2677G>T/A гена ABCB1 (rs2032582): верхний рисунок дикий генотип GG, нижний – гетерозиготаGT (обратный анализ) .

вующие в области полиморфизма – №2 (G), №6 (C), №7 (T), №8 (C) и №9 (T) встраиваются в синтезируемую цепь ДНК и детектируются пропорционально их количеству: G, CC, TT, C и T, соответственно. Анализ области полиморфизма осуществляется автоматически программным обеспечением на основании относительных высот сигналов в полиморфной области (по отношению к сигналам, соответствующих референсным нуклеотидам). На верхнем рисунке детектируется генотип CC (относительная высота встраиваемых в цепь ДНК нуклеотидов A – 0%, C – 99% и T – 1%), на нижнем – гетерозигота AC (A – 52%, C – 47% и T – 2%). Поскольку праймер, с которого проводится секвенирование (синтез второй цепи ДНК), ориентирован в обратном направлении, в соответствии с номенклатурой обозначения полиморфизма, выявленные генотипы следует обозначить как GG и GT.

Этапы пиросеквенирования

Определение нуклеотидной последовательности с помощью систем генетического анализа «PyroMark» состоит из этапов выделения ДНК, амплификации и постановки реакции пиросеквенирования.

Первым этапом анализа является наработка ампликона, содержащего полиморфный генетический локус. Этап включает в себя выделение геномной ДНК и постановку ПЦР.

При проведении ПЦР один из пары праймеров, ориентированный в обратном направлении относительно направления секвенирования заданного фрагмента ДНК, должен быть связан на 5'-конце с биотином. Цепь ДНК, включающая последовательность биотинилированного праймера, является матрицей для пиросеквенирующего синтеза. После амплификации проводится очистка и денатурация двухцепочечного ампликона. Для этого ПЦР-фрагмент инкубируется с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином, и, при помощи станции для пробоподготовки (Vacuum Prep Workstation, «Qiagen»), проводится денатурация двухцепочечной ДНК и серия отмывок, в результате которых образуется одноцепочечный ПЦР-продукт. Одноцепочечный ПЦР-продукт иммобилизируется на поверхность планшета для секвенирования, в лунки которого добавлен буфер, содержащий праймер, с которого проводится секвенирование. В результате отжига секвенирующего праймера на иммобилизированную одноцепочечную цепь ДНК образуется ДНК/ДНК-дуплекс, необходимый для синтеза второй цепи ДНК. Этап пробоподготовки 24-х образцов занимает примерно 30 минут, что существенно меньше времени, необходимого для подготовки образцов для секвенирования другими методами.

Заключительным этапом анализа является секвенирование ПЦР-продукта – проведение реакции пиросеквенирующего синтеза и анализ полученных результатов. Реакция проводится в автоматическом режиме с использованием систем генетического анализа (пиросеквенаторов) серии «PyroMark» («Qiagen»).

Набор реагентов «АмплиСенс® Пироскрин»

На базе технологии пиросеквенирования были разработаны методики для детекции более 130 генетических локусов. Критерии выбора генетических локусов для генетического анализа были следующие: исследуемые генетические полиморфизмы были описаны в работах по полногеномному скринингу ассоциаций, связанных с развитием частых мультифакториальных заболеваний, или других работах, позволяющих выявить связь или ассоциацию полиморфизма с предрасположенностью к различным состояниям и нежелательным фармакологическим реакциям. Также при выборе генетических локусов принимался во внимание спектр исследований нуклеотидных полиморфизмов, уже присутствовавших на отечественном биотехнологическом рынке. При разработке методик учитывались требования производителя оборудования для пиросеквенирования, предъявляемые к используемым для амплификации и секвенирования олигонуклеотидам и реагентам.

Часть разработанных методик была адаптирована к наиболее распространенным моделям амплификаторов и включена в набор реагентов «АмплиСенс® Пироскрин». Набор реагентов включает в себя 28 форм комплектации, для 24 форм комплектации (112 генетических полиморфизмов) получено регистрационное удостоверение (№ ФСР 2012/13246 от 19 марта 2012 г.). Формам комплектации №2-28 соответствуют профили исследований генетической предрасположенности к частым мультифакториальным заболеваниям, а также фармакогенетические и некоторые другие тесты. Список форм комплектации №2-28 и включенных в них полиморфизмов представлен в таблице. Форма комплектации №1 представляет собой набор «Пиропреп», необходимый для проведения пробоподготовки и получения одноцепочечной ДНК при детекции генетических полиморфизмов, включенных в формы комплектации №2-24.

При проведении исследования для выделения геномной ДНК могут быть использованы наборы реагентов «РИБОпреп», «ДНК-сорб-В» и другие наборы производства ФБУН «Центрального НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Программы проведения ПЦР и инструкция по пробоподготовке ампликонов с использованием станции Vacuum Prep Workstation универсальны для всех тестов, что дает возможность для одновременного анализа нескольких генетических полиморфизмов. Нуклеотидные по-

Таблица.

Профили генетических исследований и формы комплектации набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин»

Профиль генетического исследования и приложение	Исследуемые гены	Полиморфизмы
Артериальная гипертензия – «ТОНО-скрин» (форма комплектации 2)	*ADRB2, AGT, AGTR1, NOS3*	rs1042713, rs4762, rs699, rs5186, rs1799983
Ишемическая болезнь сердца – «ИБС-скрин» (форма комплектации 3)	*AMPD1, APOE, CDKN2A/2B, HIF1A, MMP3*	rs17602729, rs1333049, rs11549465, rs3025058, rs429358, rs7412
Липидный обмен, базовый профиль – «ЛИПО-Б-скрин» (форма комплектации 4)	*APOB, APOE, PCSK9*	rs429358, rs7412, rs5742904, rs754523, rs11206510
Липидный обмен, базовый профиль – «ЛИПО-Д-скрин» (форма комплектации 5)	*ABCA1, APOC3, LPL, PON1*	rs2230806, rs2854116, rs2854117, rs5128, rs268, rs328, rs854560, rs662
Плазменные факторы системы свертывания крови – «ПЛАЗМО-скрин» (форма комплектации 6)	*F2, F5, F7, FGB, SERPINE1*	rs1799963, rs6025, rs6046, rs1800790, rs1799768
Фолатный цикл – «ФОЛАТ-скрин» (форма комплектации 7)	*MTHFR, MTR, MTRR, SLC19A1*	rs1801133, rs1801131, rs1805087, rs1801394, rs1051266
Агрегационные факторы системы свертывания крови – «ТРОМБО-скрин» (форма комплектации 8)	*GP1BA, ITGB3, JAK 2, SELPLG*	rs2243093, rs6065, rs5918, rs77375493, rs2228315
Рак молочной железы и яичников – «BRCA-скрин» (форма комплектации 9)	*BRCA1, BRCA2*	rs80357713, rs28897672, rs80357522, rs80357711, rs80357906, rs80359550
Остеопороз – «ОСТЕО-скрин» (форма комплектации 10)	*COL1A1, ESR1, LCT, LRP5, VDR*	rs1800012, rs2234693, rs9340799, rs4988235, rs3736228, rs1544410
Сахарный диабет 1 типа – «ДИАБЕТ-1-скрин» (форма комплектации 11)	*C12ORF30, CLEC16A, INS, PTPN22*	rs17696736, rs12708716, rs2544677, rs689, rs2476601
Сахарный диабет 2 типа, базовый профиль – «ДИАБЕТ-2-скрин» (форма комплектации 12)	*KCNJ11, PPARG, TCF7L2*	rs5219, rs1801282, rs7903146, rs12255372
Сахарный диабет 2 типа, дополнительный профиль – «ДИАБЕТ-2Д-скрин» (форма комплектации 13)	*CDKAL1, CDKN2A/B, HHEX, IGF2BP2, SLC30A8*	rs7756992, rs10811661, rs1111875, rs4402960, rs13266634
Ожирение – «АДИПО-скрин» (форма комплектации 14)	*FTO, PPARD, PPARGC1A, PPARGC1B*	rs9939609, rs6902123, rs8192678, rs7732671
БолезньКрона – «КОЛО-скрин» (форма комплектации 15)	*NOD2, NKX2-3, PTPN2*	rs2066844, rs2066845, rs10883365, rs2542151
I фаза биотранс форма комплектации «ФАРМА-скрин-1» (форма комплектации 16)	*CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9*	rs1048943, rs1799814, rs4646903, rs762551, rs2740574, rs1799853, rs1057910
II фаза биотранс форма комплектации, профиль 1 «ФАРМА-скрин-2а» (форма комплектации 17)	*NAT2*	rs1041983, rs1801280, rs1799929, rs1799930, rs1208, rs1799931
II фаза биотранс форма комплектации, профиль 2 «ФАРМА-скрин-2б» (форма комплектации 18)	*EPHX1, GSTP1, TPMT*	rs1051740, rs2234922, rs1695, rs1138272, rs1800462, rs1800460, rs1142345
Транспорт лекарств – «ФАРМАдинамика-скрин» (форма комплектации 19)	*ABCB1, ABCG2*	rs1128503, rs2032582, rs1045642, rs2231142, rs72552713
«ФАРМА-скрин-Варфарин» (форма комплектации 20)	*VKORC1, CYP4F2, GGCX, CYP2C9*	rs9923231, rs2108622, rs11676382, rs1799853, rs1057910, rs28371686, rs9332131
«ФАРМА-скрин-Иматиниб» (форма комплектации 21)	*ULK3, VEGFR2, VEGFA*	rs2290573, rs1531289, rs1870377, rs699947, rs833061, rs3025039, rs2010963
«CCR5del32-скрин» (форма комплектации 22)	*CCR5*	rs333
«СПОРТ-мио-скрин» (форма комплектации 23)	*ACTN3, MSTN, AGT, HIF1A*	rs1815739, rs1805086, rs699, rs11549465
«СПОРТ-энерго-скрин» (форма комплектации 24)	*PPARA, PPARD, PPARG, PPARGC1A, PPARGC1B, AMPD1*	rs4253778, rs2016520, rs1801282, rs8192678, rs7732671, rs17602729
«ФАРМА-скрин-1б» (форма комплектации 25)	*CYP2C19, CYP2D6*	rs4244285, rs4986893, rs12248560, rs35742686 иrs3892097
VEGFA/NOS3-скрин (форма комплектации 26)	*VEGFA, NOS3*	rs1570360, rs2070744
UGT1A1-скрин (форма комплектации 27)	*UGT1A1*	rs8175347
IL28B-скрин (форма комплектации 28)	*IL28*	rs8099917, rs12979860

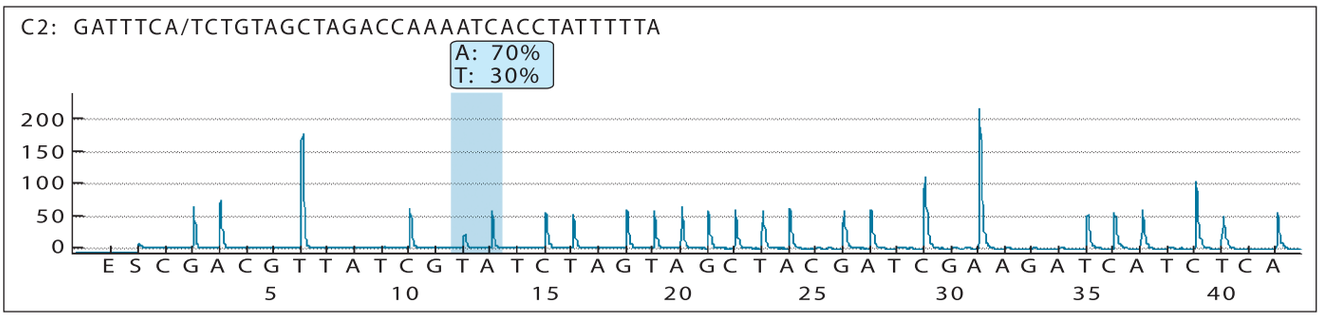

Рисунок 2.

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена BRAF – выявление мутации V600E 1799T>A.

следовательности анализируемых генетических локусов содержатся в соответствующих инструкциях к приложениям. Дополнительная информация обо всех генетических полиморфизмах, включенных в профили генетических исследований, доступна через базу данных однонуклеотидных полиморфизмов Национального центра биотехнологической информации.

С помощью системы генетического анализа «PyroMarkQ24» («Qiagen») разработана методика детекции активирующих соматических мутаций в генах KRAS и BRAF, выявление которых влияет на назначение таргетных препаратов к рецептору эпидермального фактора роста при некоторых онкологических заболеваниях. Активирующие соматические мутации в гене KRAS находятся в области 12–16 кодонов, BRAF – 593–601 кодонов. Для анализа этих генетических локусов необходимо получить нуклеотидную последовательность длиной в несколько десятков пар оснований, что дает возможность для определения любой активирующей мутации, появившейся в секвенируемой области. Предел детекции методики для самых частых мутаций составляет 3–5% мутантной фракции ДНК в анализируемом образце. Пример секвенирования нуклеотидной последовательности, соответствующей 593–601 кодонам гена BRAF, с выявленной мутацией V600E (1799T>A) представлен на рисунке 2.

Поскольку приборы для пиросеквенирования являются открытыми системами генетического анализа и есть разработанный при создании набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин» универсальный протокол исследования генетических локусов, существует возможность расширения спектра анализируемых генетических полиморфизмов и профилей генетических исследований в соответствии с публикуемыми данными о связях генетических полиморфизмов с теми или иными клиническими состояниями.

* Список литературы находится в редакции