

ОДНОВРЕМЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ЧЕТЫРЁХ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПЛАЗМЕННОГО ГЕМОСТАЗА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ ТВЕРДОФАЗНЫМ МИКРОАНАЛИЗОМ

Е. Е. Башмакова

Научный руководитель д-р. биол. наук Франк Л.А.

Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук

Определение генетических полиморфизмов плазменного гемостаза имеет важное диагностическое и прогностическое значение. Для исследования нами были выбраны четыре полиморфизма плазменного гемостаза. Три из них: мутация Лейден (FV, 1691 G->A; rs6025), полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР, 677 C->T; rs1801133) и мутация гена протромбина (F2, 20210 G->A; rs1799963) повышают риск развития тромботических явлений и развития тромбофилии. Четвертый полиморфизм – полиморфизм гена фактора свертываемости VII (F7, 10976 G->A; rs 6046) – имеет протективный эффект относительно риска развития тромбозов, снижает вероятность инфаркта миокарда и летального исхода при инфаркте миокарда.

Определение данных полиморфизмов важно в комплексе, поскольку тромбофилия – многофакторное заболевание, являющееся результатом совместного воздействия внешних факторов и генетических вариантов нескольких генов. Аналитические системы, позволяющие выявлять сразу несколько мишеней в одном анализе, являются современным направлением молекулярной диагностики и позволяют сократить временные затраты при проведении анализа.

В качестве альтернативы существующим вариантам определения SNP, предложена аналитическая технология, основанная на ферментативном удлинении аллель-специфичного праймера (primer extension reaction, PEХТ-реакция) с последующей детекцией продуктов реакции с помощью биолюминесцентных меток на основе кальций-зависимых фотопротеинов (PEД-Биолюм).

Целью настоящей работы является апробация разработанного метода PEД-Биолюм для выявления мутаций в гене пятого фактора свертывания (мутация Лейден) и в генах МТНFR, F2 и F7 и создание на его основе мультиплексного анализа для данных полиморфизмов плазменного гемостаза.

Образцы ДНК для исследований были любезно предоставлены Красноярским филиалом гематологического научного центра: по 10 образцов для выявления мутации гена F2 и мутации Лейден, 12 образцов для полиморфизма гена F7 и 9 образцов для работы с полиморфизмом гена МТГФР.

Выявление мутаций проводили одновременным биолюминесцентным методом PEД-Биолюм (Krasitskaya et al., 2013). В качестве теста сравнения был применен метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческого набора «SNP-экспресс-РВ» (НПО «Литех») и амплификатора «iCycler iQ5» (BioRad), а также набор реагентов «АмплиСенс® Пироскрин», форма комплектации №7 «Фолат-скрин» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии») и метод пиросеквенирования на приборе «PyroMark Q24» («Qiagen», Германия).

Нами было создано два пробных набора «Биолюм полиморфизм Лейден», и «Биолюм полиморфизм МТГФР 677» данные наборы были адаптированы и опробованы на 83-х и 110 образцах ДНК, соответственно в условиях клинико-диагностической лабораторий. Были получены положительные заключения от Красноярской краевой

ассоциации медицинской лаб. диагностики для набора «Биолюм полиморфизм Лейден» и от ООО «Альтермед» для набора «Болюм полиморфизм МТГФР 677».

Для разработки мультиплексного анализа мы использовали образцы ДНК, у которых определены генотипы всех четырех полиморфизмов методами ПЦР-РВ и PED-Биолюм. При проведении мультиплексного анализа синтез матриц на все четыре полиморфизма осуществляли в одной пробирке. Полученную смесь матриц использовали в четырёх отдельных РЕХТ-реакциях. Последующие этапы анализа были аналогичны анализу одного отдельно взятого полиморфизма.

Сравнение результатов тестирования выбранных образцов на наличие мутации Лейден и мутаций генов F7, MTHFR и F2 представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнение результатов методов PED-Биолюм и ПЦР-РВ при отдельном определении полиморфизмов

Полиморфизм	Количество образцов	Количество образцов для каждого варианта генотипа			Несовпадения с результатами ПЦР-РВ
		GG	GA	AA	
F2 (20210 G->A)	10	8	2	0	Образцы с генотипом GA в методе PED-Биолюм имели генотип GG
F7 (691 G->A)	12	GG 4	GA 4	AA 4	Результаты полностью совпали
F5 (1691 G->A)	10	GG 9	GA 1	AA 0	Результаты полностью совпали
МТГФР(677 C->T)	9	CC 4	CT 1	TT 4	Результаты полностью совпали

При работе с мультиплексным анализом мы не меняли условия метода PED - Биолюм и протестировали шесть образцов. Генотипы для мутации Лейден и полиморфизмов генов F2 и F7 полностью совпали с результатами ПЦР-РВ.

Для мутации гена MTHFR при мультиплексном анализе наблюдали несовпадения результатов, которые представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнение результатов, полученных при раздельном определении мутации С677Т гена МТГФР методом PED-Биолюм, с результатами мультиплексного анализа

DF при раздельном определении	Генотип при раздельном определении	DF в мультиплексном анализе	Генотип в мультиплексном анализе
4,32	CC	0.43	CT
0,03	TT	0.27	CT
0,5	CT	0.3	CT
0,03	TT	0.24	CT
2,5	CC	0.47	CT
0,03	TT	0.25	CT

Где DF – дискриминационный фактор

Мы предположили, что данные расхождения по результатам определения полиморфизма гена МТГФР связаны с конкурентной ПЦР на этапе синтеза матрицы. Мы изменили условия эксперимента следующим образом: увеличили количество праймеров для синтеза МТНFR-матрицы в реакционной смеси в 2 и в 4 раза по отношению к исходному количеству и уменьшали количество РЕХТ-праймеров, реагирующий с ДНК - матрицей, несущей мутацию, поскольку биолуминесцентный сигнал, указывающий на наличие в образце мутантной ДНК для гомозиготного генотипа (СС), был высок и значения DF соответствовали гетерозиготному генотипу (СТ). Но данные модификации условий реакции не изменили результатов определения мутации гена МТГФР.

Мы осуществили синтез матриц для полиморфизмов МТГФР и F2 и МТГФР и F5 попарно, чтобы оценить влияние синтеза матриц F2 и F5 на определение полиморфизма гена МТГФР. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты определения полиморфизма С677Т МТГФР в двух вариантах мультиплексного анализа

DF (генотип) при отдельном определении	DF (генотип) в мультиплексе F2+МТГФР	DF Генотип в мультиплексе F5+МТГФР
0.5 (СТ)	0.5 (СТ)	0.61 (СТ)
2.5 (СС)	1.07 (СС)	0.89 (?)
0.03 (ТТ)	0.31 (СТ)	0.26 (СТ)

Как видно из таблицы 3, присутствие в реакционной смеси праймеров для синтеза как матрицы для определения мутации Лейден, так и для синтеза матрицы для определения полиморфизма гена F2 влияет на результат определения.

В обоих случаях наблюдалось несовпадение для образцов, имеющих генотип гомозиготный по аллелю Т. Для генотипа гомозиготного по аллелю С, соответствующего нормальному варианту, наблюдалось совпадение результата мультиплекса для полиморфизмов генов МТГФР и F2 с результатом отдельного определения. А при совместном определении полиморфизмов генов МТГФР и F5 результат было трудно интерпретировать, поскольку дискриминационный фактор (DF) имел пограничное значение 0.89: высокое для гетерозиготного генотипа (DF генотипа СТ = 0.2-0.6) и низкое для нормального генотипа (СС) (DF=1-5).

Таким образом, результаты отдельного определения методом РЕД-Биолом полностью совпали с коммерческими наборами при выявлении полиморфизмов генов МТГФР, фактора свертываемости VII и мутации Лейден и выявлено два случая расхождения для полиморфизма гена протромбина.

Метод РЕД-Биолом опробован для мультиплексного анализа и показана возможность одновременной детекции мутации Лейден, полиморфизма фактора свертываемости VII и гена протромбина.