

ческая значимость различных диагностических ГХ-МС критериев: диагностическая чувствительность (от 79,6% до 97,2%), диагностическая специфичность (от 50,0% до 92,7%) и диагностическая предсказуемость (положительная (от 61,8% до 94,7%) и отрицательная (от 60,9% до 95,1%)).

Заключение. Разработанные ГХ-МС критерии сифилиса имеют высокий уровень диагностической чувствительности (79,6–97,2%), диагностической специфичности (50,0–92,3%), диагностической предсказуемости положительной (61,3–94,7%), диагностической предсказуемости отрицательной (60,9–95,1%), что позволяет рекомендовать их в качестве лабораторных диагностических критериев развития сифилиса. Разработан «Способ лабораторной диагностики изменений центральной нервной системы при сифилисе» (патент РФ № 2315303) и «Способ лабораторной диагностики инфекционной патологии почек при сифилисе» (патент РФ № 2327165).

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ И НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

**Мионов К.О., Дедков В.Г., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П.,
Смирнова Т.Ю., Тогаева-Рыжих А.Б., Потехина Е.С., Колотвин В.В.,
Шипулин Г.А.**

*ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва,
Россия*

Введение. В зависимости от вклада генетических факторов и факторов внешней среды в патогенез заболевания выделяют моногенные и мультифакториальные болезни. К мультифакториальным заболеваниям относится большинство хронических болезней, связанных с поражением сердечно-сосудистой, дыхательной, желудочно-кишечной, эндокринной и других систем организма, а также ряд онкологических синдромов. Вероятность возникновения, тяжесть течения и прогноз мультифакториальных заболеваний обусловлены комбинированным действием неблагоприятных факторов окружающей среды и генетических факторов риска, формирующих наследственную предрасположенность к заболеванию. Современные исследования полногеномного скрининга ассоциаций (Genome-Wide Association Study) часто позволяют определить генетические полиморфизмы, связанные

с развитием мультифакториальных заболеваний. На сегодняшний день описано большое количество полиморфизмов в геноме человека, для которых показана ассоциация с развитием мультифакториальных заболеваний и патологических синдромов; постоянно публикуются новые данные.

Риск возникновения мультифакториального заболевания, как правило, обусловлен сочетанием полиморфизмов в нескольких генах, и реализуются только при наличии соответствующих неблагоприятных средовых факторов. Поэтому выявление аллелей риска в генетических локусах, связанных с риском развития того или иного заболевания, является важной задачей профилактической медицины. Детекция полиморфизмов в клинически значимых генетических локусах позволяет выявлять группы лиц с высоким риском развития заболевания до появления клинических симптомов, а также определять риск развития осложнений основного заболевания, осложнений, связанных с хирургическими вмешательствами или применением лекарственных средств.

Наиболее часто встречающимися генетическими полиморфизмами являются однонуклеотидные полиморфизмы (Single nucleotide polymorphism, SNP). В отличие от мутаций, полиморфизмами принято называть изменения в геноме, встречающиеся в наблюдаемой популяции с частотой не менее 1%. Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов используется широкий спектр молекулярно-биологических методов, основанных на ПЦР. К наиболее распространенным методам генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов можно отнести анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, аллель-специфическую ПЦР, методики, основанные на ПЦР в режиме реального времени, гибридизацию с использованием ДНК-чипов, минисеквенирование с последующим масс-спектрометрическим анализом, а также методы секвенирования ДНК. Создание методик детекции однонуклеотидных полиморфизмов на основе не прямых молекулярно-биологических методов требует дополнительной валидации создаваемых тестов и подтверждения секвенированием. Одним из наиболее распространенных методов секвенирования является секвенирование с использованием меченых флуоресцентными красителями дидезокситерминаторов и последующим разделением продуктов амплификации с помощью капиллярного гель-электрофореза (метод секвенирования по Сэнгеру); данный метод позволяет получать протяженные нуклеотидные последовательности длиной 300-700 п.н. Другим методом секвенирования, специально разработанным для секвенирования коротких нуклеотидных фрагментов, является пиросеквенирование.

Метод пиросеквенирования, также обозначаемый как пиросеквенирующий синтез или секвенирование путем синтеза, основан

на детекции высвобождающегося при синтезе ДНК пирофосфата. Высвобождение пирофосфата осуществляется после встраивания соответствующего нуклеотида во вновь синтезируемую цепь ДНК. В реакции пиросеквенирующего синтеза участвуют четыре фермента (ДНК-полимераза, АТФ-сульфурилаза, люцифераза, апираза) и смесь субстратов для ферментов (аденозин-5'-фосфосульфат и люциферин). При добавлении в реакционную смесь первого нуклеотида ДНК-полимераза катализирует присоединение нуклеотида к праймеру для секвенирования. Если добавляемый нуклеотид комплементарен последовательности ДНК-матрицы, присоединение нуклеотида к 3'-концу секвенирующего праймера (синтез ДНК) сопровождается выделением пирофосфата. В результате последующих ферментативных превращений происходит образование видимого света, который детектируется ССD-камерой прибора-пиросекватора и отображается в виде пиков на графике (пирограмме). Высота пиков пропорциональна количеству нуклеотидов, встроившихся во вновь синтезированную, комплементарную ДНК-матрицу, цепь ДНК. Добавление нуклеотидов в реакционную смесь осуществляется последовательно в соответствии с нуклеотидной последовательностью анализируемого генетического локуса. В соответствии с последовательностью и интенсивностью сигналов на пирограмме, определяется нуклеотидная последовательность исследуемого генетического локуса.

Цель и задачи. Разработка наборов реагентов для детекции клинически значимых полиморфизмов с помощью системы генетического анализа PyroMark. Выбор генетических полиморфизмов, ассоциированных с часто встречающимися заболеваниями и клиническими синдромами. Дизайн праймеров для детекции генетических полиморфизмов и оптимизация методики пиросеквенирования, общей для всех генетических локусов, включенных в исследование.

Материалы и методы. Определение нуклеотидной последовательности генетического локуса с помощью системы генетического анализа PyroMark состоит из следующих этапов: амплификации фрагмента, содержащего полиморфный генетический локус (этап включает в себя выделение ДНК из клинического материала и постановку ПЦР), пробоподготовки ПЦР-продукта, иммобилизации одноцепочечного ампликона на твердую поверхность, отжиг секвенирующего праймера и постановку реакции пиросеквенирующего синтеза. При выделении ДНК и постановке ПЦР использованы наборы и реагенты производства ФГУН «Центрального НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

После проведения ПЦР ампликон инкубируется с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином. С помощью станции для пробоподготовки (Vacuum Prep Workstation) проводится щелочная денатурация

ампликона и серия отмывок, в результате которых образуется одноцепочечный ПЦР-продукт, который иммобилизуется на дно планшета для пиросеквенирования. При проведении пробоподготовки был использован набор «Пиропреп» производства ФГУН «Центрального НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. К одноцепочечному ПЦР-продукту добавляется секвенирующий праймер, который отжигается в области анализируемого генетического локуса, образуя дуплекс ДНК-матрица/секвенирующий праймер, необходимый для проведения реакции секвенирующего синтеза. Заключительным этапом анализа является секвенирование ПЦР-продукта – проведение реакции пиросеквенирующего синтеза и анализ полученных результатов. Детекция результатов пиросеквенирующего синтеза проводилась автоматически с помощью пиросеквенаторов «PyroMark Q24» и «PyroMark Q96 MD» производства фирмы «Qiagen» (Германия). Анализ результатов секвенирования проводился автоматически программным обеспечением прибора.

Основные результаты.

С помощью Интернет-ресурсов PubMed и OMIM Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) проведен анализ результатов научных исследований, касающихся изучения связи полиморфизмов в геноме человека с различными патологическими состояниями. Выбранные генетические полиморфизмы объединены в группы – профили исследований, которые могут быть использованы при изучении генетической предрасположенности к развитию часто встречающихся в клинической практике патологических состояний. В таблице приведены разработанные профили и входящие в них генетические локусы.

| Профиль генетического исследования | Генетические локусы* |
|---|---|
| Сердечно-сосудистые заболевания – артериальная гипертензия | <i>ADRB2, AGT (2), AGTR1, NOS3</i> |
| Сердечно-сосудистые заболевания – ишемическая болезнь сердца | <i>AMPD1, APOE (2), CDKN2A/2B, HIF1A, MMP3</i> |
| Сердечно-сосудистые заболевания – ишемический инсульт | <i>APOE (2), F5, IL-6, ITGB3, MTHFR, PON1 (2)</i> |
| Нарушения липидного обмена – базовый профиль | <i>APOB (2), APOE (2), PCSK9</i> |
| Нарушения липидного обмена – дополнительный профиль | <i>ABCA1, APOC3 (3), LPL (2), PON1 (2)</i> |
| Плазменные факторы системы свертывания крови | <i>F2, F5, F7, FGB, SERPINE1</i> |

| <i>Продолжение табл.</i> | |
|--|---|
| Профиль генетического исследования | Генетические локусы* |
| Фолатный цикл | <i>MTHFR (2), MTR, MTRR, SLC19A1</i> |
| Агрегационные факторы системы свертывания крови | <i>GP1BA (2), ITGB3, JAK 2, SELPLG</i> |
| Эндотелиальные факторы | <i>VEGFA (3), NOS3 (2)</i> |
| Рак молочной железы и яичников | <i>BRCA1 (5), BRCA2</i> |
| Остеопороз | <i>COL1A1, ESR1 (2), LCT, LRP5, VDR</i> |
| Сахарный диабет 1 типа | <i>C12ORF30, CLEC16A, INS, PTPN22</i> |
| Сахарный диабет 2 типа – базовый профиль | <i>KCNJ11, PPARG, TCF7L2 (2)</i> |
| Сахарный диабет 2 типа* – дополнительный профиль | <i>CDKAL1, CDKN2A/B, HHEX, IGF2BP2, SLC30A8</i> |
| Ожирение/метаболический синдром | <i>FTO, PPARD, PPARGC1A, PPARGC1B</i> |
| Болезнь Крона | <i>NOD2 (2), NKX2-3, PTPN2</i> |
| Фармакогенетическое тестирование – I фаза биотрансформации, профиль 1 | <i>CYP1A1 (3), CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 (2)</i> |
| Фармакогенетическое тестирование – I фаза биотрансформации, профиль 2 | <i>CYP2C19 (3), CYP2D6 (2), CYP2E1 (2)</i> |
| Фармакогенетическое тестирование – II фаза биотрансформации, профиль 1 | <i>NAT2 (6)</i> |
| Фармакогенетическое тестирование – II фаза биотрансформации, профиль 2 | <i>EPHX1 (2), GSTP1 (2), TPMT (3)</i> |
| Фармакогенетическое тестирование – варфарин | <i>VKORC1, CYP4F2, GGCX, CYP2C9 (4)</i> |
| Иммунная система | <i>IL-6, IL8, IL4, IL10 (3), IL18, IFNG, FCGR2A, HIF1A, TNF (2), CCR2, TLR1, IL1B</i> |
| CCR5del32 | <i>CCR5</i> |

* – если проводится тестирование более чем одного генетического полиморфизма, количество тестируемых полиморфизмов указано в скобках.

Разработка профилей генетических исследований и фармакогенетических тестов проводилась с учетом опубликованных в научной литературе данных о результатах полногеномного скрининга ассоциаций полиморфных генетических локусов (GWAS), связанных с развитием основных мультифакториальных заболеваний. Подробная информация о полиморфизмах в исследуемых генах включена в инструкции к разработанным наборам реагентов. Полная информация обо всех генетических полиморфизмах, включенных в разрабаты-

ваемые профили генетических исследований, доступна через базу данных однонуклеотидных полиморфизмов Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США). Профили фармакогенетических тестов включают наиболее часто встречающиеся однонуклеотидные полиморфизмы в генах ферментов, вовлеченных в процессы детоксикации ксенобиотиков и биотрансформации лекарственных средств. При выборе мишеней для фармакогенетических тестов также учитывались опубликованные рекомендации и возможность использования некоторых информационных ресурсов, позволяющих проводить количественную оценку дозы препарата в зависимости от генотипа пациента: <http://www.warfarindosing.org/> и <http://nat2pred.rit.albany.edu/>.

При разработке методики и клинической апробации тестов для детекции генетических полиморфизмов учитывались особенности используемой платформы для генетического анализа. Для проведения анализа методом пиросеквенирования одного генетического локуса необходимо выбрать три праймера; использование методики пиросеквенирования накладывает ряд ограничений на дизайн праймеров и протокол амплификации. При амплификации фрагмента ДНК один из пары праймеров должен быть связан на 5'-конце с биотином; цепь ДНК, которая послужит матрицей для пиросеквенирующего синтеза, амплифицируется с биотинилированным праймером. В зависимости от направления секвенирования возможны два типа анализа: прямой анализ (forward analysis) и обратный анализ (reverse analysis). В первом случае с биотином связан обратный праймер для амплификации, во втором – прямой праймер для амплификации. Размер продукта амплификации не должен превышать 250 п.н. (оптимально использование коротких фрагментов до 150 п.н.) и не должен образовывать жестких вторичных структур. Необходимо исключить неспецифический отжиг праймера для секвенирования и выбрать последовательность для анализа (порядок ввода нуклеотидов в реакционную смесь при синтезе ДНК) оптимальным образом. При разработке генетических тестов удалось реализовать все требования, предъявляемые к используемым для амплификации и секвенирования праймерам, и унифицировать протоколы амплификации и пробоподготовки для анализа всех тестируемых генетических полиморфизмов.

Заключение. Проведен обзор опубликованных в научной литературе данных, касающихся ассоциаций полиморфных генетических локусов с мультифакториальными заболеваниями и некоторыми онкологическими синдромами, также проанализированы результаты фармакогенетических исследований. На основании опубликованных данных выбраны мишени для детекции более 130 генетических поли-

морфизмов, ассоциированных с часто встречающимися в клинической практике заболеваниями и синдромами. На основании выбранных мишеней разработаны наборы реагентов (профили генетических исследований), предназначенные для севенирования полиморфных локусов с помощью систем генетического анализа PyroMark. В настоящее время, в соответствии с публикуемыми научными данными, проводится работа по расширению спектра анализируемых генетических полиморфизмов и профилей генетических исследований, осуществляется создание систем, направленных на выявление соматических мутаций в опухолевых клетках, и поиск мишеней в геноме человека, ассоциированных с восприимчивостью к некоторым инфекционным заболеваниям.

ДНК-ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИЙ С ПОМОЩЬЮ КОНВЕКЦИОННОЙ ПЦР С НАКЛОННЫМ ГРАДИЕНТОМ ТЕМПЕРАТУР

**Мурзабаев М.Р.¹, Магданов Э.Г.¹, Гарафутдинов Р.Р.¹, Шальков П.А.²,
Чемерис Д.А.¹, Волкова Е.В.³, Урманчиев С.Ф.³, Чемерис А.В.¹**

*¹ Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия;*

*² ГОУ ВПО «Уфимский государственный авиационный технический университет»,
Уфа, Россия;*

*³ Учреждение Российской академии наук Институт механики Уфимского
научного центра РАН, Уфа, Россия*

Полимеразная цепная реакция (ПЦР), не рассчитанная на протекание в изотермических условиях, требует циклического изменения температур, поскольку для того, чтобы начался очередной цикл, должна произойти денатурация исходной ДНК, а в дальнейшем и ампликонов с последующим отжигом праймеров и их удлинением. Так как температурные переходы в реакционном блоке или полости воздушной камеры и, соответственно, в реакционной смеси не происходят мгновенно, значительное время тратится на периодический нагрев и охлаждение блока или камеры и содержимого пробирок до нужной температуры, на что уходит длительность протекания ПЦР остается довольно большой и сократить ее крайне важно для быстрого выявления инфекционных агентов, особенно для случаев полевой диагностики. Меняющаяся неоднородная температура в реакционной смеси характерна для случаев проведения ПЦР с использованием эффекта