

Мультиплексное генотипирование SNP-маркеров наследственной тромбофилии методом SNaPshot*

Голубенко М.В., Бабушкина Н.П., Гончарова И.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; e-mail maria.golubenko@medgenetics.ru

Актуальность. Тестирование наследственной предрасположенности к тромбозам является одной из актуальных задач медико-генетического консультирования. Информация о повышенном риске нарушений свертываемости крови является важной для предупреждения осложнений беременности, тромбоза, тромбоэмболии и других жизнеугрожающих состояний. **Цель.** Разработать панель олигонуклеотидных проб для мультиплексного генотипирования методом SNaPshot основных SNP, связанных с наследственной тромбофилией. **Материалы и методы.** В список генотипируемых полиморфизмов вошли rs6025, rs6027, rs1800595 (*F5*); rs1799963 (*F2*); rs5918 (*ITGB3*). Для разработки проб и ПЦП-праймеров использовали программы Vector NTI и Primer3. **Результаты.** После подбора последовательности проб для генотипирования различной длины была проведена пробная реакция с набором Primer Focus kit, подтвердившая возможность мультиплексирования данных полиморфизмов. Осуществлено генотипирование контрольных образцов ДНК с известными генотипами. Определенные методом SNaPshot генотипы во всех случаях соответствовали генотипам, полученным другими методами. **Выводы.** Разработана и верифицирована панель олигонуклеотидных проб для мультиплексного генотипирования пяти полиморфизмов в генах факторов свертывания крови II, V и тромбоцитарного рецептора фибриногена (rs1799963, rs6025, rs6027, rs1800595, rs5918). Разработанная методика позволяет ускорить и автоматизировать процесс генотипирования.

Ключевые слова: наследственная тромбофилия, минисеквенирование, SNaPshot, факторы свертываемости крови

Введение

Несмотря на развитие новых технологий, позволяющих получать информацию о вариантах нуклеотидной последовательности в масштабе всего генома или экзона, в практике медико-генетического консультирования во многих случаях предпочтительным является генотипирование нескольких наиболее значимых сайтов (мутаций, полиморфизмов) для диагностики конкретного заболевания (или подверженности к многофакторному заболеванию). Тестирование наследственной предрасположенности к тромбозам является одной из актуальных задач медико-генетического консультирования, поскольку тромбофилия играет важную роль в патогенезе целого спектра патологий. У многих людей, имеющих склонность к тромбозам, симптомы заболевания зачастую не проявляются или проходят незамеченными до наступления острых клинических состояний. Ранние инфаркты и инсульты, рецидивирующие тромбозы, тромбоэмболии, возникающие без видимых факторов риска, атипичные и семейные тромбофилии являются клиническими маркерами генетических дефектов гемостаза.

В настоящее время известно несколько десятков генов, контролирующих функционирование системы гемостаза и отвечающих за предрасположенность к тромбофилии. Наиболее значимыми по клиническим проявлениям являются варианты пятого фактора свертываемости крови (*F5*), в том числе «мутация Лейден», мутации гена протромбина (*F2*) и гена субъединицы GpIIIa рецепторов тромбоцитов (*ITGB3*).

Мутация Лейден — это миссенс-замена Arg506Gln (G1691A, rs6025). Наличие аллеля А определяет резистентность к активированному протеину С и развитие тромбофилии. Мутация Лейден распространена с частотой 3—20% в европеоидных популяциях и является фактором риска возникновения венозных и артериальных тромбозов, особенно у женщин на фоне приема оральных контрацептивов [1—2]. Кроме мутации Лейден, существует еще несколько полиморфизмов в этом гене, повышающих риск тромбоза, в том числе rs6027 и rs1800595. Мутация в гене протромбина (rs1799963) представляет собой транзицию G20210A и локализована в 3'-нетранслируемом районе гена. Эта замена стабилизирует мРНК, что ведет к повышению уровня протромбина. Аллель А, ассоциированный с повышенным риском возникновения венозных тромбозов и cerebrovasкулярных тромбо-окклюзионных заболеваний, в европеоидных популяциях распространен с частотой от 1 до 4% [3]. Полиморфизм гена *ITGB3* (rs5918) приводит к замене аминокислоты Pro33Leu (T196C). Патологический аллель С (PLA2) распространен в популяции с частотой до 15% и является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, cerebrovasкулярной патологии, фетоплацентарной недостаточности и гестозов, ретинальных микротромбозов у больных сахарным диабетом [4]. Выявление генетической предрасположенности к нарушениям в системе свертывания крови и последующее адекватное лечение помогают избежать до

* Работа была частично поддержана ФЦП «Кадры» (гос. контракт № П977 от 20.08.2009 г.)

70% смертельных случаев и тяжелых осложнений, вызванных наследственной тромбофилией.

Целью настоящего исследования была разработка панели ДНК проб для одновременного генотипирования полиморфных вариантов генов, характеризующих наличие наследственной тромбофилии, методом минисеквенирования SNaPshot.

Материалы и методы

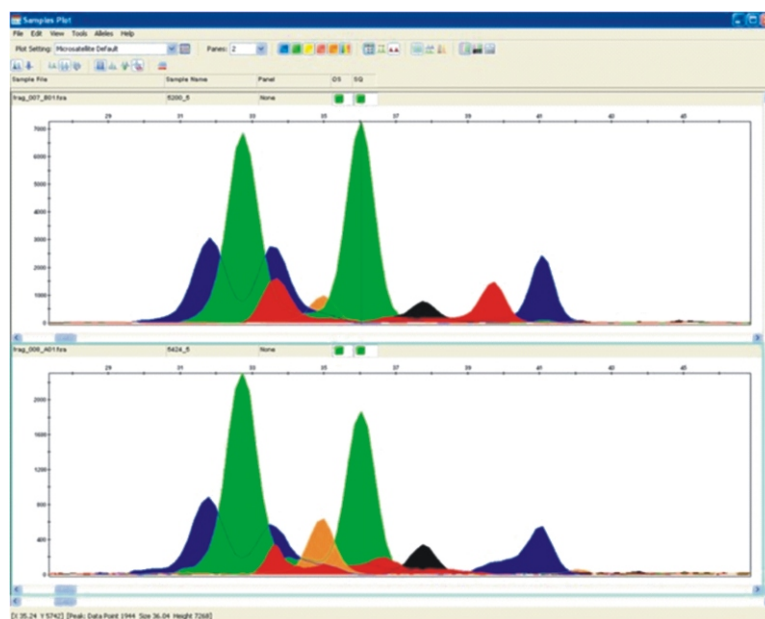
В разрабатываемую панель были включены полиморфизмы, генотируемые для расчета риска наследственной тромбофилии: rs6025, rs6027, rs1800595 (*F5*); rs1799963 (*F2*); rs5918 (*ITGB3*). В качестве технологии генотипирования был выбран метод SNaPshot, который позволяет одновременно генотипировать около 10 однонуклеотидных полиморфизмов на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе. Методика SNaPshot включает этапы предварительной ПЦР-амплификации, ферментативное удаление неинкорпорированных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и праймеров, реакцию минисеквенирования

с флюоресцентно мечеными «терминаторами», очистку от неинкорпорированных «терминаторов», электрофорез и анализ на автоматическом ДНК-анализаторе («Applied Biosystems», США). Реакцию минисеквенирования проводили с использованием наборов Primer Focus kit и SNaPshot multiplex kit («Applied Biosystems», США). Для разработки проб и ПЦР-праймеров использовали программы Vector NTI и Primer3 [5–6]. Пробы подбирали с учетом следующих условий: различия по длине между пробами минимум 4 нуклеотида; отсутствие альтернативных сайтов отжига в используемых ПЦР-продуктах; температура плавления 58–62°C; возможность перекрывания проб по длине, если генотируемые аллели не совпадают (Т ↔ С и А ↔ G). Возможность мультиплексирования и диапазон ожидаемых сигналов были определены при проведении реакции с набором Primer Focus kit. Для верификации панели использовали образцы ДНК с уже известными генотипами, полученными «традиционными» методами ПДРФ-анализа, аллель-специфичной ПЦР, ПЦР в реальном времени.

Таблица

Характеристика олигонуклеотидных проб для минисеквенирования

№	Ген, SNP	Ориентация	Последовательность в направлении 5'-3'	Аллели	Диапазон определяемой длины (бины)			
					A	T	C	G
1	F2 rs1799963	R	GATCAATAGCACTGGGAGCATTGAGGCT	T/C	—	38,5-39,9	36,6-37,5	—
2	F5 rs6025	R	GATCGATCGATCTAAGAGCAGATCGCTGGACAGGC	A/G	42,1-43,1	—	—	40,4-41,4
3	F5 rs6027	R	CGCCTGGAACCTCTTGGCTGTG	A/G	35,5-36,4	—	—	33,5-35,4
4	F5 rs1800595	R	CCCATTCTCCAGACCTCAGCC	A/G	31,3-33,9	—	—	29-32
5	ITGB3 rs5918	F	CCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC	C/T	—	32,5-35	29,5-30,5	—



Хроматограммы SNaPshot-анализа для 2 образцов ДНК:

Rs1800595: синий пик ~32 нк (G), зеленый пик ~33 нк (A); rs5918: красный пик ~33,5 нк (TT); rs6027: синий пик ~33,5 нк (G), зеленый пик ~36 нк (A); rs1799963: черный пик ~37,5 нк (C), красный пик ~40 нк (T); rs6025: синий пик ~41 нк (GG).

Результаты и обсуждение

В процессе разработки набора проб были проанализированы характеристики температуры плавления ДНК в области исследуемых полиморфизмов, а также характер генотипируемых замен. Исходя из этого, было подобрано 5 проб, из которых большинство соответствовали обратной цепи референсной последовательности (таблица). Пробы для rs5918 и rs6027 имели одинаковую длину, так же как и пробы для rs1799963 и rs1800595, но в этих парах генотипировались разные замены: С→Т и А→Г. Были также подобраны ПЦР-праймеры (однако для данного метода можно использовать любые праймеры, амплифицирующие исследуемые участки генома).

После подбора последовательности проб для генотипирования была проведена пробная реакция с набором Primer Focus Kit, подтвердившая возможность мультиплексирования данных полиморфизмов. В результате эксперимента выяснилось, что реально определяемая длина фрагмента для rs6027 и rs1800595 отличалась от рассчитанной, поэтому проба для rs1800595 была сокращена на 8 нуклеотидов с 5'-конца, чтобы разделить пики для этих двух полиморфизмов. Затем было осуществлено генотипирование восьми контрольных образцов ДНК с известными генотипами, с использованием набора SNaPshot Multiplex Kit, согласно протоколу производителя. Анализ результатов был проведен в программе Fragment Analysis (рисунок). Для автоматического анализа генотипов были обозначены границы диапазона длины фрагмента, в котором должен определяться сигнал с соответствующего аллеля — так называемые бины. Согласно результатам анализа, определенные методом SNaPshot генотипы во всех случаях соответствовали генотипам, полученным другими методами. Таким образом, разработанная панель олигонуклеотидных проб позволяет генотипиро-

вать выбранные полиморфизмы «в одной пробирке» с использованием SNaPshot-подхода.

Выводы

Нами разработан набор олигонуклеотидных проб для мультиплексного генотипирования пяти полиморфизмов в генах факторов свертывания крови II, V и тромбоцитарного рецептора фибриногена (rs1799963, rs6025, rs6027, rs1800595, rs5918), предрасполагающих к наследственной тромбофилии. Генотипирование с использованием данного набора проб должно осуществляться методом однонуклеотидного удлинения пробы флуоресцентно мечеными дидезоксинуклеозидтрифосфатами с последующим разделением продуктов реакции на капиллярном ДНК-анализаторе. Разработанная методика позволяет ускорить и автоматизировать процесс генотипирования.

Список литературы

1. Phillippe HM, Hornsby LB, Treadway S, et al. Inherited Thrombophilia. *Journal of Pharmacy Practice*. 2014;27(3):227-233.
2. Yilmaz S, Gunaydin S. Inherited risk factors in low-risk venous thromboembolism in patients under 45 years. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*. 2015;20:21-23.
3. Moussaoui S, Saussoy P, Ambroise J, et al. Genetic Risk Factors of Venous Thromboembolism in the East Algerian Population. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2015; DOI: 10.1177/1076029615600789
4. Ahmad F, Kannan M, Vinita Yadav V, et al. Impact of Thrombogenic Mutations on Clinical Phenotypes of von Willebrand Disease. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2010; 16(3):281-287.
5. Rozen S., and Skaletsky H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. P. 365-386.
6. Lu G, Moriyama EN. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform*. 2004;5(4):378-388.

Multiplex genotyping of hereditary thrombophilia SNPs by SNaPshot technique

Golubenko M.V., Babushkina N.P., Goncharova I.A.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRC; e-mail maria.golubenko@medgenetics.ru

Relevance: Testing of hereditary predisposition to thrombosis is an actual topic in medical genetic counseling. Information about increased risk for clotting abnormalities is important for preventing pregnancy complications, deep venous thrombosis, thromboembolism and other life-threatening conditions. **Aim:** To develop set of oligonucleotide probes for multiplex genotyping of several polymorphisms in the genes influencing thrombosis risk, using SNaPshot minisequencing technique. **Materials and methods:** The list of polymorphisms consisted of rs6025, rs6027, rs 1800595 in *F5*; rs1799963 in *F2*; rs5918 in *ITGB3*. For selecting the probes and PCR primers, Vector NTI и Primer3 programs were used. **Results:** After picking up the probes, possibility of multiplexing the polymorphisms in one tube was confirmed by Primer Focus kit reaction. Then several DNA samples with known genotypes were genotyped using the probes. In all cases, the genotypes determined by SNaPshot method corresponded to the genotypes detected by other methods. **Conclusions:** Panel of oligonucleotide probes for multiplex genotyping of five polymorphisms in the genes for coagulation factors II and V, and for integrin beta-3 (rs1799963, rs6025, rs6027, rs1800595, rs5918), has been developed and verified. The method allows speeding up and automatization of the genotyping process.

Keywords: thrombosis, minisequencing, SNaPshot, coagulation factors