

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.01.34-43>

Разработка и характеристика метода многолокусной метилчувствительной ПЦР в режиме реального времени

Николаева А.Ф., Сигин В.О., Калинин А.И., Танас А.С., Стрельников В.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

Введение. Метод метилчувствительной количественной ПЦР (МЧ-кПЦР) в режиме реального времени впервые описан в настоящей работе в многолокусном формате с использованием TaqMan-зондов. Многолокусный формат реакции облегчает тестирование больших выборок пациентов и способствует бережному расходованию коллекционных образцов биологического материала, а также позволяет включать в состав тест-систем необходимые контроли, обеспечивающие оценку полноты гидролиза матрицы и эффективности ПЦР.

Цель: разработать тест-систему многолокусной МЧ-кПЦР для количественного анализа уровня метилирования ДНК и охарактеризовать её аналитические свойства.

Методы. Материалом исследования служили смеси ДНК с заданным уровнем метилирования (препаратов ДНК, гидролизованных и негидролизованных метилчувствительной рестриктазой). Считали, что ДНК, необработанная метилчувствительной рестриктазой BstHNI, является модельной метилированной матрицей, в то время как гидролизованная ДНК – модельной неметилированной матрицей. МЧ-кПЦР проводили для двух целевых локусов – участков CpG-островков генов *PRKCB* и *GMD5* с включением положительного внутреннего контроля эффективности ПЦР и контроля полноты гидролиза геномной ДНК метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции. Для кинетических кривых исследуемых локусов с помощью пакета qpcR языка программирования R во всех образцах получены значения C_{q0} , и на основе этих данных рассчитали уровни метилирования модельных препаратов с заданными уровнями метилирования. Аналитическую чувствительность метода определяли путем нахождения значений Limit of Blank (LoB, измеряемое значение при отсутствии метилирования) и Limit of Detection (LoD, наименьший измеряемый уровень метилирования).

Результаты. Определены аналитические свойства метода МЧ-кПЦР: аналитическая чувствительность составила 5%; относительная погрешность составила 11,38%; коэффициент детерминации (R^2) для локусов *PRKCB* и *GMD5* составил 0,98 и 0,77, соответственно. Результаты измерений по локусу *GMD5* позволили предположить его моноаллельное метилирование в нормальных лимфоцитах крови, что было подтверждено анализом баз данных метилома человека. Исходя из полученных результатов, аналитическая чувствительность метода МЧ-кПЦР выше таковой метода прямого бисульфитного секвенирования по Сэнгеру и не уступает методу бисульфитного пиросеквенирования.

Ключевые слова: количественная ПЦР; метилирование ДНК; мультиплексная ПЦР; метилчувствительные эндонуклеазы рестрикции.

Для цитирования: Николаева А.Ф., Сигин В.О., Калинин А.И., Танас А.С., Стрельников В.В. Разработка и характеристика метода многолокусной метилчувствительной ПЦР в режиме реального времени. *Медицинская генетика* 2022; 21(1): 34-43.

Автор для корреспонденции: Николаева Александра Федоровна, e-mail: alex.ru97@bk.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2022 году.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.01.2022

Development and characterization of the method for multilocus methylation sensitive real-time PCR

Nikolaeva A.F., Sigin V.O., Kalinkin A.I., Tanas A.S., Strelnikov V.V.

Research Centre for Medical Genetics
1 Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russian Federation

Background. The method of multiplex methylation sensitive quantitative real-time PCR (MS-qPCR) is used for the first time in the format of a multiplex system with TaqMan probes. The previously described approaches to MSRE-qPCR are insufficient for the implementation of the technique in studies of large samples of patients, which is due to the lack of a multiplex reaction format and internal controls. We propose an MS-qPCR method with the possibility of multiplexing and the presence of internal PCR controls.

Aim: to characterize the analytical properties of the developed multiplex MS-qPCR method.

Methods. DNA from lymphocytes from healthy donors was used as a material for the study. We have postulated that DNA undigested with methylation sensitive restriction enzyme is a model methylated template (undigested), while hydrolyzed DNA is a model unmethylated template. To determine the analytical sensitivity, mixtures of digested and undigested DNA were used. Development of the MS-qPCR panel was carried out taking into account the design requirements developed by the team: the inclusion of a positive internal control of the PCR efficiency and a control of digestion of genomic DNA by the methylation sensitive restriction enzyme. For the kinetic curves of the studied loci in all samples, C_{y0} values were obtained using the qPCR package of the R programming language, and on the basis of these data, methylation levels were calculated, and box plots were presented. The analytical sensitivity of the method was determined by finding the Limit of Blank (LoB) and Limit of Detection (LoD) values.

Results. The coefficient of determination (R^2) for the normally non-methylated locus is 0.98, and for the locus with normal monoallelic methylation, 0.77. Analytical sensitivity of the MS-qPCR method is 5%; the relative error was 11.38%.

Conclusions. Based on the results obtained, the analytical sensitivity of the MS-qPCR method is higher than that of the direct Sanger bisulfite sequencing, and comparable to bisulfite pyrosequencing. The use of TaqMan probes allows multiplexing of several target loci in one reaction, which is a fine solution to the problem of a small amount of available biological material.

Keywords: quantitative PCR; DNA methylation; multiplex PCR; methylation sensitive restriction enzymes.

For citation: Nikolaeva A.F., Sign V.O., Kalinkin A.I., Tanas A.S., Strelnikov V.V. Development and characterization of the method for multilocus methylation sensitive real-time PCR. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2022; 21(1): 34-43. (In Russ.)

Corresponding author: Aleksandra F. Nikolaeva, e-mail: alex.ru97@bk.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.01.2022

Введение

На сегодня метилирование ДНК является одним из основных предметов исследования в контексте изучения новообразований. Данный механизм имеет фундаментальное значение в клеточных процессах, участвует в развитии многих заболеваний, таких как различные виды рака и даже возрастные изменения [1]. Гиперметилирование CpG-островков приводит к инактивации генов-супрессоров опухолевого роста (гены, контролирующие клеточный цикл, репарацию ДНК и апоптоз) [2]; гипометилирование ДНК вызывает активацию мобильных геномных элементов, что приводит к геномной нестабильности [3]. Паттерны метилирования ДНК обратимы и динамичны, что позволяет организму адаптироваться к изменениям окружающей среды или лечению [4, 5]. Аберрантное метилирование ДНК рассматривается в качестве биомаркера для диагностики злокачественных новообразований, а надежная оценка уровня аберрантного метилирования ДНК возможна только с использованием количественных методов анализа [4].

Количественные методы анализа метилирования ДНК, основанные на бисульфитной конверсии, имеют ограничения (деградация ДНК в ходе бисульфитной конверсии, невозможность различения модификаций 5-метилцитозин (5mC) и 5-гидроксиметилцитозин (5hmC)) [6, 7, 8], которые можно устранить, в том числе, благодаря совершенствованию методов, основанных на рестрикционном анализе. В данной статье

описан усовершенствованный метод метилчувствительной количественной ПЦР (МЧ-кПЦР) в режиме реального времени. Преимущество предлагаемого метода заключается в применении TaqMan-зондов, благодаря которым появляется возможность мультиплексирования в одной реакции нескольких целевых локусов и внутренних контролей, позволяющих исключать ложноположительные и ложноотрицательные результаты в сравнении с описанными ранее подходами [9, 10]. Предлагаемая методика анализа уровня метилирования ДНК является успешным решением проблемы малого количества материала и может быть использована в исследованиях больших выборок пациентов.

На данный момент описано множество подходов к анализу уровня метилирования ДНК [11-14], однако правильный выбор метода не всегда зависит от его преимуществ и ограничений. Для применения в биомедицинских исследованиях важно понимать основные характеристики используемого метода – аналитическую чувствительность, погрешность [15, 16].

В данной работе описываются основные этапы разработки тест-системы для количественного определения уровня метилирования ДНК на основе МЧ-кПЦР. Приводится описание подхода к оценке аналитических свойств метода МЧ-кПЦР. Основные стратегии, основанные на нашем собственном опыте, подробно описаны в разделе методов.

Методы

Материалом для характеристики метода многолокусной МЧ-кПЦР служила смесь гидролизованной и негидролизованной метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции ДНК. Для определения аналитической чувствительности метода использовали разные соотношения гидролизованной (модельной неметилованной) и негидролизованной (модельной метилованной) ДНК. Геномную ДНК из лимфоцитов периферической крови выделяли методом фенолхлороформной экстракции, согласно стандартному протоколу [17].

Гидролиз ДНК метилчувствительной рестриктазой

Гидролиз ДНК проводили в реакционной смеси: 350 нг нативной ДНК смешивали с 3,5 мкл реакционного 10x SE-буфера Y (СибЭнзим, Россия) и гидролизовали с добавлением 175 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции BstHNI (сайт узнавания GCG/C) (СибЭнзим, Россия) в конечном объеме 35 мкл при температуре 50°C в течение 16 часов.

Реакционный буфер рестриктазы содержит высокую концентрацию ионов магния, что может влиять на условия последующей ПЦР. С целью уравнивания содержания ионов магния и других компонентов в препаратах с заданным уровнем метилирования ДНК для приготовления модельной метилованной матрицы (негидролизованной) использовали моск-гидролиз: добавляли все компоненты реакции гидролиза в тех же концентрациях за исключением фермента, вместо которого использовали равный объем SE-буфера для хранения и разбавления ферментов (СибЭнзим, Россия).

Во избежание остаточной ферментативной активности после гидролиза пробы инактивировали путем инкубации 60 мин при 95 °С.

Моделирование уровня метилирования ДНК

Для характеристики метода использовали препараты с заданным уровнем метилирования ДНК, которые получали смешиванием в соответствующих соотношениях модельных метилованной и неметилованной матриц (табл. 1). Считали, что ДНК, не обработанная метилчувствительной рестриктазой BstHNI, является модельной метилованной матрицей (Me+, негидролизованная), в то время как гидролизованная ДНК – модельной неметилованной матрицей (Me-).

Критерии дизайна праймеров и зондов

Для выбора конкретных участков целевых CpG-островков для дизайна праймеров проводили анализ геномных последовательностей при помощи компьютерных программ UCSC BLAT, UCSC Genome Browser, NCBI BLAST с целью определения возможности изучения статуса их метилирования методом метилчувствительной ПЦР. Применяли следующие критерии выбора участков генома для включения в исследование: наличие трех-шести сайтов узнавания метилчувствительной рестриктазы; длина потенциального ПЦР-продукта не более 300 п.н.; протяженность участков ДНК, фланкирующих целевой продукт и не содержащих сайтов узнавания рестриктазы, не менее 50 п.н.

В состав тест-системы были включены положительный внутренний контроль эффективности ПЦР (PC – Positive Control) и контроль полноты гидролиза ДНК метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции (DC – Digestion Control). Дизайн праймеров проводили с помощью программного обеспечения MPprimer 1.4. В качестве локуса для положительного контроля выбрали участок межгенного CpG-островка на хромосоме 6p21.32, не содержащий сайтов узнавания используемой рестриктазы. Для контроля полноты гидролиза использовали геномный локус, содержащий

Таблица 1 / Table 1

Соотношения модельной метилованной (Me+) и модельной неметилованной (Me-) матриц для моделирования заданного уровня метилирования ДНК в образце.

Ratios of model methylated (Me+) and model unmethylated (Me-) matrices for modeling a given level of DNA methylation in a sample.

Моделируемый уровень метилирования, %	Me-, мкл	Me+, мкл
0	10	0
1	9,9	0,1
2,5	9,75	0,25
5	9,5	0,5
10	9	1
25	7,5	2,5
50	5	5
75	2,5	7,5
90	1	9
100	0	10

2 сайта узнавания рестриктазой и неметилированный как в норме, так и в опухолях (*TMEM158*).

Подбор совместимых пар праймеров и зондов

Используя компьютерную программу MPprimer (<http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/>), подбирали наборы пар праймеров и зондов для выбранных локусов для температур отжига в диапазоне от 50 до 74°C с потенциальными длинами от 16 до 24 п.н., совместимые в одной реакции, то есть не образующие вторичных структур и нецелевых продуктов ПЦР. Праймеры для амплификации целевых и контрольных локусов, используемые в тест-системе, представлены в **табл. 2**.

При дизайне TaqMan-зондов использовали LNA-модификации 2-4 оснований в составе олигонуклеотидных зондов. LNA (locked nucleic acid) обладают высоким сродством к комплементарным молекулам-мишеням ДНК и РНК [18], и включение

их в состав зонда позволяет настраивать температуру плавления дуплекса матрица/зонд [19]. Температуру плавления TaqMan-зондов с включением LNA оценивали с помощью программы OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies) (**табл. 3**).

Многолокусная ПЦР в режиме реального времени

МЧ-кПЦР проводили в амплификаторе QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием разработанной многолокусной тест-системы (**табл. 2 и 3**) с использованием на и зондов, меченых флуоресцентными красителями FAM, HEX, Cy5, Cy5.5. В качестве референсного красителя использовали ROX. Для амплификации использовали наборы реагентов GenPak® DNA PCR Core (Изоген, Россия). В пробирку с лиофилизированным премиксом добавляли 10 мкл PCR Diluent, 10 нг ДНК, 0,18 мкМ каждого праймера (**табл. 2**), 0,125 мкМ каждого зонда

Таблица 2 / Table 2

Последовательности праймеров тест-системы для метилчувствительной количественной ПЦР

Primer sequences of the test system for methyl-sensitive quantitative PCR

Название локуса	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина продукта ПЦР, п.н.	Расчётная температура отжига, t°C	Количество сайтов узнавания BstHNI
PC6	F: TAGAGGAAGTCGTAGAGGTGT R: TCATTGTGTCTTGACAACCG	244	58,86 58,08	0
DC_TMEM158	F: CCCAGGTGCTCGATG R: CGACCTACTGCTCTTCTCC	97	58,13 58,45	2
PRKCB_2	F: TCAAGAACCACAAATTCACCG R: ACTGTCCATCCGGGAGT	240	58,83 58,39	6
GMDS_1	F: CAGCTCCCCTCACTTCTC R: TCGCTTCGATGTGAGTATCT	148	58,12 58,12	3

Таблица 3 / Table 3

Последовательность и температура отжига зондов до и после LNA-модификации по данным программы «OligoAnalyzer Tool», где (+N) – LNA-модифицированный нуклеотид

The sequence and temperature of probe annealing before and after LNA modification according to the OligoAnalyzer Tool software, where (+N) is the LNA modified nucleotide

Локус	Последовательность зонда		T _{отж} °C	
	до LNA-модификации	после LNA-модификации	До LNA	после LNA
PC6	CGGCACTAGCAGAGACC	CGG(+C)ACTAG(+C)AGAGACCA	64	70
DC_TMEM158	CGAAGAAAGCGCGGCCG	CGAAGA(+A)AGCGCGGCCGT	69	70
PRKCB_2	CTTCATCTGGTGAGCG	CTT(+C)A(+T)CT(+G)GT(+G)AGCG	58	70
GMDS_1	CCCAGCCCTGAGAGC	CCCG(+A)CCC(+T)GAG(+A)GC	62	70

(табл. 3), 0,14 мкМ референсного красителя, деионизированную воду до 20 мкл. Смесь прогревали при 95°C в течение 5 минут и проводили 50 циклов ПЦР с параметрами: 95°C – 30 с, 58°C – 120 с.

Определение эффективности ПЦР

Эффективность ПЦР определяли методом последовательных кратных разбавлений образца (50 нг/мкл, 25 нг/мкл, 12,5 нг/мкл, 6,25 нг/мкл, 3,125 нг/мкл) по наклону *a* линии регрессии ($y = -ax + b$), опи-

сывающей зависимость порогового цикла *Cy0* кинетической кривой от логарифма концентрации ДНК *LogC0* в образце, где $y = Cy0$, $x = LogC0$. В программе Microsoft Excel заполняли таблицу по столбцам для различных концентраций образца ДНК *LogC0* значения порогового цикла *Cy0*, измеренного методом кПЦР (табл. 4). По полученным парам значений строили точечную диаграмму, на которую добавляли линию тренда (рис. 1). Параметры линии регрессии *a* и *b* определяли по значениям параметров линии тренда.

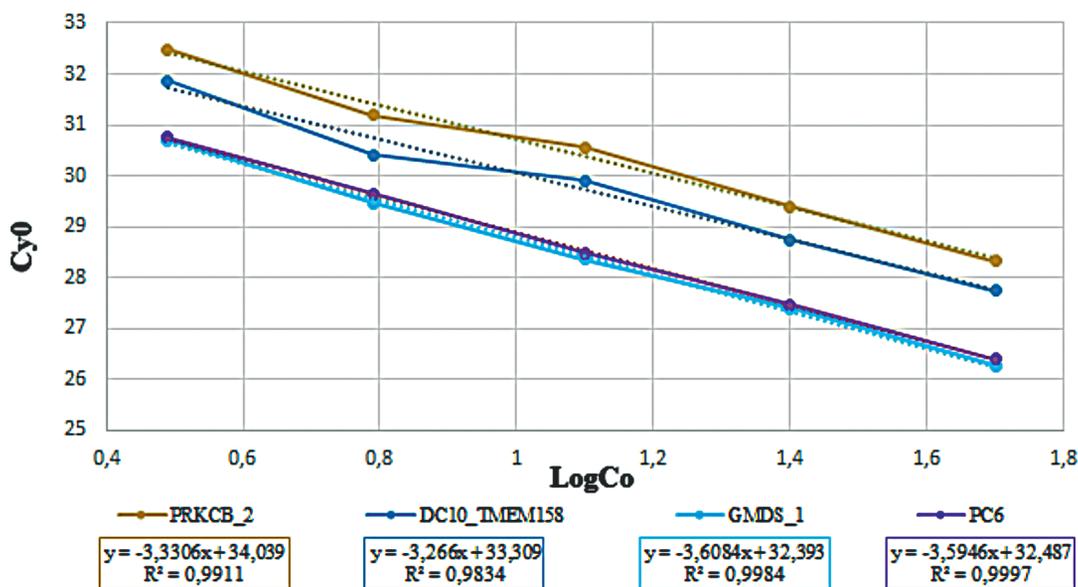


Рис. 1. График зависимости порогового цикла (*Cy0*) от логарифма входной концентрации матрицы (*LogC0*) для каждого локуса тест-системы. Пунктирной линией обозначена линия тренда. В прямоугольниках указано уравнение прямой и достоверность аппроксимации (*R*²).

Fig. 1. Plot of dependence of the threshold cycle (*Cy0*) on the logarithm of the input concentration of the matrix (*LogC0*) for each locus of the test system. The dotted line indicates the trend line. The rectangles indicate the equation of the straight line and the reliability of the approximation (*R*²).

Таблица 4 / Table 4

Зависимость значения порогового цикла (*Cy0*) от исходной концентрации матриц (*LogC0*) каждого локуса тест-системы
Dependence of the value of the threshold cycle (*Cy0*) on the initial concentration of matrices (*LogC0*) of each locus of the test system

Локус	1,7	1,4	1,1	0,79	0,49	LogC0
PC6	26,39	27,46	28,48	29,64	30,75	Cy0
DC10_TMEM158	27,74	28,74	29,91	30,4	31,86	
PRKCB_2	28,33	29,39	30,56	31,19	32,47	
GMDS_1	26,27	27,39	28,36	29,46	30,7	

Эффективность ПЦР для каждого локуса вычисляли по формуле $E = 10^{\frac{1}{a}}$.

Определение уровня метилирования по данным МЧ-кПЦР

Определение уровня метилирования по данным МЧ-кПЦР проводили методом $\Delta\Delta C_y0$. В отличие от значений C_t и C_p , значение C_y0 учитывает кинетические параметры кривой амплификации и не зависит от изменения эффективности ПЦР [20]. В данном подходе касательные, рассчитанные на основе различной эффективности ПЦР, имеют тенденцию пересекаться в общей точке около оси x , что приводит к меньшим изменениям в значениях C_y0 в сравнении с другими методами.

Значение уровня метилирования таргетного локуса tgt относительно локуса PC , не содержащего сайтов узнавания рестриктазы, определяли по следующим формулам в парах образцов MS (обработанный метилчувствительной рестриктазой) и $mock$ (без обработки):

$$\Delta C_y0_{PC} = C_y0_{PC}^{MS} - C_y0_{PC}^{mock} \quad (1)$$

где $C_y0_{PC}^{MS}$ – значение C_y0 для локуса PC при обработке метилчувствительной рестриктазой, $C_y0_{PC}^{mock}$ – значение C_y0 для локуса PC без обработки метилчувствительной рестриктазой.

$$\Delta C_y0_{tgt} = C_y0_{tgt}^{MS} - C_y0_{tgt}^{mock} \quad (2)$$

где $C_y0_{tgt}^{MS}$ – значение C_y0 для целевого локуса при обработке метилчувствительной рестриктазой, $C_y0_{tgt}^{mock}$ – значение C_y0 для целевого локуса без обработки метилчувствительной рестриктазой.

$$\Delta\Delta C_y0 = \Delta C_y0_{tgt} - \Delta C_y0_{PC} \quad (3)$$

$$B_{tgt} = \frac{E_{PC} \Delta C_y0}{E_{tgt} \Delta\Delta C_y0} \quad (4)$$

где B_{tgt} – измеренный уровень метилирования целевого локуса, E – эффективность ПЦР.

Определение аналитической чувствительности метода МЧ-кПЦР

МЧ-кПЦР проводили в 16 повторностях для каждого препарата ДНК с заданным уровнем метилирования.

Для определения аналитической чувствительности метода определяли значение LoB (Limit of Blank) на основании среднего и дисперсии измеренного уровня метилирования в образце, не содержащем аналита ($blank$), за который принимали образец с заданным уровнем ме-

тилирования 0% ($Me-$), и уровень метилирования LoD (Limit of Detection), измеряемый как достоверно отличный от измерений образца без аналита, т.е., показывающий не менее 90% измерений выше значения LoB (тестируют образцы с заданным уровнем метилирования $\geq 1\%$), по ранее опубликованной методике [21]:

$$LoB = M(B_{blank}) + 1,645 \cdot SD(B_{blank}) \quad (5)$$

Определение относительной погрешности метода МЧ-кПЦР

При определении относительной погрешности метода вычисляли среднее арифметическое из 16 измерений по формуле:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i \quad (6)$$

где n – количество измерений в эксперименте, x_i – результат i -го измерения. Определяли среднеквадратичную погрешность среднего арифметического по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{\sum ((x_i - \bar{x})^2)}{n(n-1)}} \quad (7)$$

Находили полуширину доверительного интервала (абсолютную погрешность результата измерений) по формуле:

$$\Delta x = \sqrt{\Delta x_{сл}^2} \quad (8)$$

где $\Delta x_{сл}$ – случайная погрешность.

Вычисляли $\Delta x_{ca} = t_{\alpha, n} S$, где $t_{\alpha, n}$ – коэффициент Стьюдента при $\alpha = 0,95$). Оценивали относительную погрешность результата измерений, согласно формуле:

$$\delta = \frac{\Delta x}{\bar{x}} \quad (9)$$

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием коэффициента детерминации R^2 для оценки доли дисперсии зависимой переменной, объясняемой рассматриваемой моделью зависимости. Коэффициент детерминации определяли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel по формуле: =КОРРЕЛ (значения модельного уровня метилирования; значения измеренного уровня метилирования)^2.

Стандартные отклонения использовали в качестве метрики оценки погрешности [22] измеренного уровня метилирования. Стандартные отклонения определяли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel по формуле: =СТАНДОТКЛОН (значение метилирования – групповое метилирование).

Для кинетических кривых исследуемых локусов во всех образцах получены значения S_{y0} с использованием пакета `qpcR` языка программирования R. На основе полученных данных рассчитаны значения $\Delta\Delta S_{y0}$, уровни метилирования, и построены диаграммы размаха (бокс-плоты).

Результаты

Коллективом лаборатории разработан метод многолокусной МЧ-кПЦР для определения уровня метилирования ДНК. Основные характеристики метода оценивали с помощью тест-системы, нацеленной на 2 гена (*PRKCB*, *GMDS*).

Таблица 5 / Table 5

Эффективность ПЦР локусов тест-системы

Efficiency of PCR loci of the test system

Локус	Эффективность ПЦР
PC6	1,883 (94,15%)
DC_TMEM158	1,947 (97,35%)
PRKCB_2	1,950 (97,50%)
GMDS_1	1,882 (94,10%)

Путем кратных разведений ДНК, полученной из лимфоцитов периферической крови, определили эффективность ПЦР-амплификации (табл. 4, 5; рис. 1).

В табл. 5 представлены результаты определения эффективности ПЦР для всех локусов тест-системы.

С использованием экспериментальной модели для определения уровня метилирования ДНК и методов статистического анализа оценили характеристики разработанного метода многолокусной МЧ-кПЦР: аналитическую чувствительность и относительную погрешность. Для определения аналитической чувствительности метода определяли значение LoB (Limit of Blank) для генов *PRKCB* и *GMDS* с соответствующим уровнем метилирования. Модельный уровень метилирования прямо коррелирует с уровнем метилирования, определенным методом $\Delta\Delta S_{y0}$ (табл. 6).

Коэффициент детерминации (R^2) для локуса *PRKCB_2* составил 0,98; коэффициент детерминации (R^2) для локуса *GMDS_1* составил 0,77.

По данным 16 повторностей получены средние значения измеренного уровня метилирования (табл. 6) и построены диаграммы размаха (рис. 2, 3). В качестве референсного гена выступал внутренний контроль амплификации *PC6*.

Далее определили аналитические свойства метода МЧ-кПЦР. Аналитическая чувствительность метода

Таблица 6 / Table 6

Средние значения и стандартные отклонения ($\pm SD$) уровня метилирования целевых локусов тест-системы по данным 16 повторностей

Mean values and standard deviations ($\pm SD$) of the methylation level of the target loci of the test system according to 16 replicates

Модельный уровень метилирования, %	PRKCB_2			GMDS_1		
	Измеренный уровень метилирования, %	$\pm SD$	CI90%	Измеренный уровень метилирования, %	$\pm SD$	CI90%
0	0,78	0,25	0,37-1,19*	71,1	4,09	64,4-77,86
1	1,68	1,24	-0,43-3,64	54,08	13,5	31,1-75,5
2,5	3,03	1,64	0,32-5,7	60,86	11,5	41,5-79,35
5**	3,29	0,82	1,98-4,69	71,2	2,93	66,34-75,97
10	8,79	1,49	6,48-11,38	68,16	3,64	62,06-74,03
25	24,4	2,55	20,08-28,5	73,85	8,46	60,15-87,98
50	53,81	4,44	46,38-60,9	87,52	4,67	80,37-95,72
75	74,02	14,36	49,3-96,55	93,85	4,69	86,17-101,59
90	87,4	6,74	76,91-99,1	97,18	4,4	90,21-104,7
100	101,07	1,23	98,66-102,69	100,39	0,55	99,45-101,26

Примечание: * – значение LoB ; ** – значение LoD .

многолокусной МЧ-кПЦР составила 5%. В 90% измерений образца с модельным уровнем метилирования 5% измеряемое значение уровня метилирования выше значения LoB (1,19%) (табл. 6). Это показывают данные диаграмм размаха, где выбросы (точки единичных данных) представлены в областях с уровнем метилирования <5%. Относительная погрешность метода составила 11,38%.

Обсуждение

Метилирование ДНК – обратимая ковалентная эпигенетическая модификация, которая присоединяет метильную группу к цитозиновому остатку в CpG-динуклеотиде в позиции 5 пиримидинового

кольца. Метилирование ДНК, наряду с модификацией гистонов и РНК-интерференцией, является краеугольным эпигенетическим механизмом регуляции экспрессии генов. Заболевания, связанные с нарушениями метилирования ДНК, включают в себя группу болезней импринтинга (синдромы Прадера-Вилли, Энгельмена, Видеманна-Беквита, Сильвера-Рассела и др.). Аномальное метилирование играет важную роль в канцерогенезе и является одним из маркеров, имеющих как прогностическое, так и предиктивное значение.

В связи с этим, разработка новых методов анализа метилирования ДНК приобретает всё большую популярность, что отражается в приросте публикаций, связанных с изучением механизмов метилирования

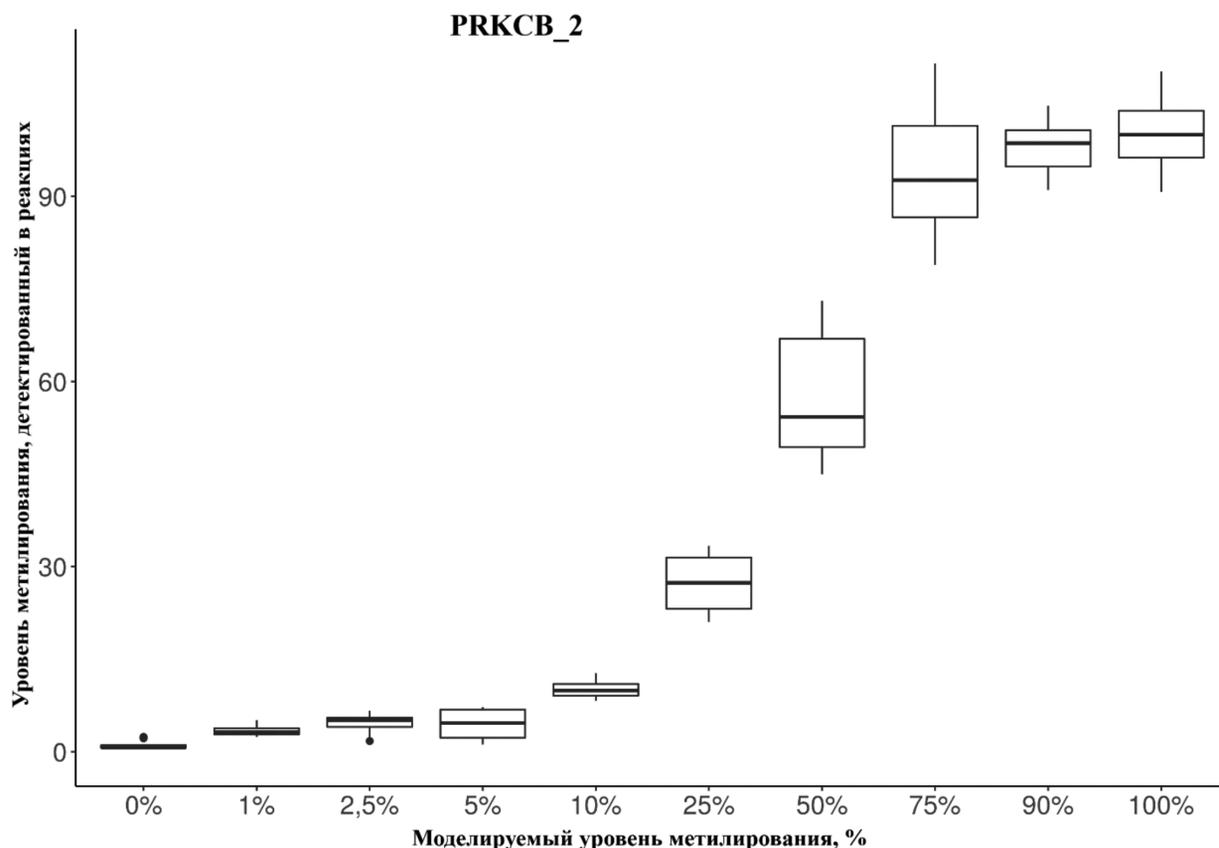


Рис. 2. Уровень метилирования локуса PRKCB_2. По оси ординат – уровень метилирования, детектированный в реакциях, от 0% до 100%. По оси абсцисс – заданный уровень метилирования от 0% (полностью неметилированный образец) до 100% (полностью метилированный образец).

Fig. 2. Methylation level of the PRKCB_2 locus. The ordinate axis shows the level of methylation detected in the reactions, from 0% to 100%. The abscissa shows the target methylation level from 0% (completely unmethylated sample) to 100% (completely methylated sample).

и сравнительной характеристикой методов изучения метилирования ДНК.

Нами разработан метод количественного определения уровня метилирования ДНК на базе многолокусной метилчувствительной ПЦР в режиме реального времени с использованием TaqMan-зондов, и определены аналитические характеристики метода на примере тест-системы, включающей целевые локусы (участки CpG-островков генов *GMDS* и *PRKCB*), положительный контроль, не содержащий сайтов узнавания метилчувствительной рестриктазы, и контроль полноты гидролиза ДНК. Эффективный гидролиз ДНК в образце является ключевым этапом при использовании методов, основанных на рестрикционном анализе.

С целью оценки коэффициента детерминации зависимости измеряемого значения уровня метилирования от уровня метилирования в образце было произведено моделирование уровня метилирования, где полностью негидролизованная матрица выступала в качестве модельной метилированной (Me+), а гидролизованная матрица – модельной неметилированной (Me-) ДНК.

Обнаружено, что для локуса *PRKCB_2* измеренный уровень метилирования коррелирует с заданным уровнем метилирования с $R^2=0,98$. Для локуса *GMDS_1* для образцов, в которых присутствует только гидролизованная матрица (Me-), значение измеренного уровня метилирования близко к 50%, а для образцов, в ко-

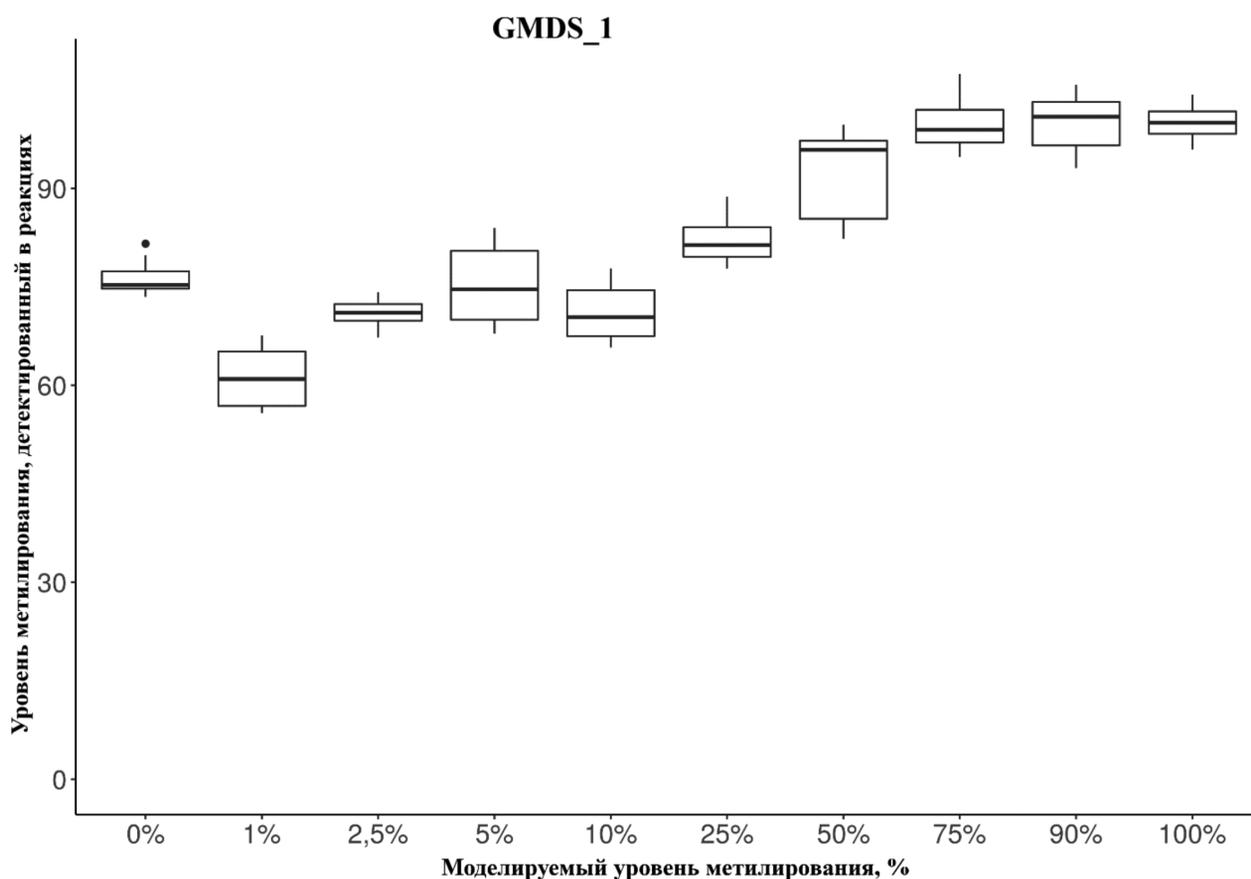


Рис. 3. Уровень метилирования локуса *GMDS_1*. По оси ординат – уровень метилирования, детектированный в реакциях, от 0% до 100%. По оси абсцисс – заданный уровень метилирования от 0% (полностью неметилированный образец) до 100% (полностью метилированный образец).

Fig. 3. The level of methylation of the *GMDS_1* locus. The ordinate axis shows the level of methylation detected in the reactions, from 0% to 100%. The abscissa shows the target methylation level from 0% (completely unmethylated sample) to 100% (completely methylated sample).

торых гидролизованная (Me-) и негидролизованная (Me+) матрицы представлены в равных соотношениях, значение измеренного уровня метилирования близко к 75%. Наблюдаемый феномен наилучшим способом можно объяснить наличием моноаллельного метилирования исследуемого локуса GMDS_1 в ДНК из клеток крови здоровых доноров. Это предположение подтверждается по данным полногеномного бисульфитного секвенирования в образце ДНК В-клеток крови в базе данных NgsMethDB [23].

Исходя из полученных результатов, аналитическая чувствительность метода МЧ-кПЦР (5%) выше таковой метода прямого бисульфитного секвенирования по Сэнгеру (15-20%) [24] и не уступает методу бисульфитного пиросеквенирования (5%) [25]. В отличие от методов, основанных на бисульфитной конверсии, пробоподготовка МЧ-кПЦР не приводит к деградации ДНК. Применение TaqMan-зондов позволяет мультиплексировать несколько целевых локусов в одной реакции, что является удачным решением проблемы малого количества биологического материала, позволяя увеличить количество технических повторов, а, следовательно, точность анализа, благодаря чему метод МЧ-кПЦР может быть использован для определения уровня метилирования панелей генов в образцах с малым количеством ДНК (в частности, в биоптатах тканей).

Литература/References

1. Beikircher G., Pulverer W., Hofner M., et al. Multiplexed and sensitive DNA methylation testing using methylation-sensitive restriction enzymes "MSRE-qPCR". *Methods Mol Biol.* 2018; 1708: 407-424. doi: 10.1007/978-1-4939-7481-8_21.
2. Radhakrishnan R., Kabekkodu S., Satyamoorthy K. DNA hypermethylation as an epigenetic mark for oral cancer diagnosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2011; 40(9): 665-676.
3. Kulis M., Esteller M. DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics* 2010; 70: 27-56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.
4. Yoo C.B., Jones P.A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(1): 37-50.
5. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *NEJM* 2008; 358(11): 1148-1159.
6. Tanaka K., Okamoto A. Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 Apr 1; 17(7): 1912-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.01.040.
7. Raizis A.M., Schmitt F., Jost J.P. A Bisulfite Method of 5-Methylcytosine Mapping That Minimizes Template Degradation. *Anal Biochem.* 1995; 226(1): 161-166.
8. Grunau C., Clark S.J., Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(13): E65-5. doi: 10.1093/nar/29.13.e65.
9. Amena H.Z., Tohyama C., Ohsako S. Dioxin induces Ahr-dependent robust DNA demethylation of the Cyp1a1 promoter via Tdg in the mouse liver. *Sci Rep.* 2016; 6: 34989. doi: 10.1038/srep34989.
10. Krygier M., Podolak-Popinigis, Limon J., et al. A simple modification to improve the accuracy of methylation-sensitive restriction enzyme quantitative polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 2016; 500: 88-90. doi: 10.1016/j.ab.2016.01.020.
11. Umer M., Hecceg Z. Deciphering the epigenetic code: An overview of DNA methylation analysis methods. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(15): 1972-86. doi: 10.1089/ars.2012.4923.
12. Pajares M.J., Palanca-Ballester C., Urtasun R., et al. Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods* 2021; 187: 3-12. doi: 10.1016/j.ymeth.2020.06.021.
13. Dahl C., Guldberg P. DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology* 2003; 4(4): 233-50. doi: 10.1023/a:1025103319328.
14. Lekanne Deprez R.H., Fijnvandraat A.C., Ruijter J.M., et al. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem.* 2002; 307(1): 63-69.
15. Huggett J.F., Cowen S., Foy C.A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem.* 2015; 61(1): 79-88.
16. Thomassin H., Kress C., Grange T. MethylQuant: a sensitive method for quantifying methylation of specific cytosines within the genome. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(21): e168. doi: 10.1093/nar/gnh166.
17. Köchl S., Niederstätter H., Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 2005; 297: 13-30.
18. Tolstrup N., Nielsen P.S., Kolberg J.G., et al. OligoDesign: optimal design of LNA (locked nucleic acid) oligonucleotide capture probes for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3758-62. doi: 10.1093/nar/gkg580.
19. Mouritzen P., Nielsen A.T., Pfundheller H.M., et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using locked nucleic acid (LNATM). *Expert Rev Mol Diagn.* 2003; 3(1): 27-38.
20. Guescini M., Sisti D., Rocchi M.B.L., et al. Accurate and Precise DNA Quantification in the Presence of Different Amplification Efficiencies Using an Improved Cy0 Method. *PLoS One* 2013; 8(7): e68481. doi: 10.1371/journal.pone.0068481.
21. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29 Suppl 1(Suppl 1): S49-52.
22. Ucar I., Pebesma E., Azcorra A. Measurement Errors in R. *The R Journal.* 2019; 10(2): 549-557.
23. Lebrón R., Gómez-Martín C., Carpena P., et al. NGSmethDB 2017: enhanced methylomes and differential methylation. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(D1): D97-D103.
24. Lewin J., Schmitt A.O., Adorján P., et al. Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics* 2004; 20(17): 3005-12. doi: 10.1093/bioinformatics/bth346.
25. Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: Choosing the right method. *Biology (Basel)* 2016; 5(1): 3. doi: 10.3390/biology5010003.