



УДК 577.217

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН

© 2005 г. **Е. В. Бреннер***, *******, **Е. М. Иванова****, **Д. В. Пышный****, **И. В. Морозов****

*Новосибирский государственный университет, Новосибирск;

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступило в редакцию 30.08.2004 г. Принято к печати 22.09.2004 г.

Предложен метод идентификации точковых мутаций, основанный на аллельспецифичной полимеразной цепной реакции. В качестве модели использована мутация R408W гена фенилаланингидроксилазы человека. Селективность метода обеспечивается использованием праймеров, неполностью комплементарных геномной ДНК. Дифференциальная идентификация по изменению электрофоретической подвижности продуктов ПЦР, соответствующих разным аллельным вариантам, обеспечивается ковалентным присоединением к одному из аллельспецифичных праймеров остатка полиэтиленгликоля.

Ключевые слова: аллельспецифичная ПЦР, полиэтиленгликоль, фенилкетонурия.

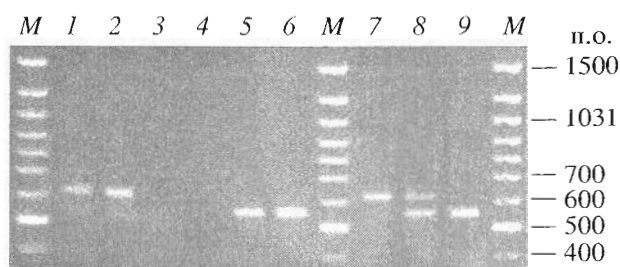
В современной медико-генетической практике идентификация типов мутаций имеет важное значение. На сегодняшний день самым надежным способом идентификации всех типов мутаций является определение нуклеотидной последовательности и ее сравнение с эталоном, но пока этот метод недостаточно доступен для повсеместного применения. Для регистрации мутаций используются также подходы, основанные на изменении физико-химических свойств фрагмента ДНК (например, электрофорез в градиенте денатурирующего агента и т.п.), однако они недостаточно информативны, так как не дают сведений о типе и положении мутации. Для рутинной идентификации известной мутации также используются косвенные методы, например полиморфизм длин рестрикционных фрагментов. Однако использование эндонуклеаз рестрикции, необходимое в этом случае, усложняет метод и не всегда возможно.

Альтернативным методом, потенциально позволяющим идентифицировать любую известную мутацию, является аллельспецифичная ПЦР (АС-ПЦР). При реализации этого метода необходимо обеспечить достаточную специфичность амплификации и возможность дифференциальной детекции продуктов ПЦР, как правило, имеющих одинаковую длину, но соответствующих разным аллельным вариантам. Для достижения необходимой специфичности гибридизации праймеров зачастую оказывается недостаточно, чтобы 3'-концевые нуклеотиды праймеров были комплементар-

ны тому или иному аллельному варианту. Для обеспечения специфичности используют аллельспецифичные праймеры (АС-праймеры) с модифицированным рибозофосфатным остовом (Locked Nucleic Acid (LNA)-праймеры) [1] или олигонуклеотиды, являющиеся конкурентными ингибиторами неспецифической гибридизации праймеров [2]. Для дифференциальной детекции разных аллелей часто используются праймеры, меченные различными флуорохромами. Однако этот метод требует относительно дорогостоящей модификации праймеров и дополнительного оборудования для регистрации их флуоресценции. Для идентификации аллельных вариантов методом агарозного гель-электрофореза используют также АС-праймеры разной длины [3]. При этом разница в длине праймеров должна быть значительной, что приводит к существенным различиям их гибридизационных свойств и снижению специфичности метода в целом.

Другим вариантом является выбор последовательности АС-праймеров из обеих цепей матричной ДНК. Каждый из этих праймеров используется совместно с отдельным обратным праймером, при этом сайты гибридизации обратных праймеров должны быть расположены с обеих сторон от детектируемой мутации [4]. Преимущество такого подхода – возможность получения значительно различающихся по длине продуктов ПЦР, соответствующих разным аллельным вариантам. Однако этот подход имеет и ряд недостатков. Так, АС-праймеры не конкурируют за сайты гибридизации, что может приводить к снижению специфичности. Вторым недостатком, общим для

Автор для переписки (тел.: (3832) 30-46-59; факс: (3832) 33-36-77; эл. почта: brenner@niboch.nsc.ru).



Результат электрофореза в 1.5% агарозном геле продуктов АС-ПЦР с геномной ДНК R408W(-/-) – 1, 4, 7; R408W(+/-) – 2, 5, 8 и R408W(+/+) – 3, 6, 9. Использованные праймеры (см. текст): 1–3 – норма и общий; 4–6 – мутация и общий; 7–9 – норма, мутация и общий. M – маркеры длин ДНК GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Литва).

любой системы ПЦР, в которой параллельно нарабатывается несколько продуктов, является различная эффективность амплификации фрагментов разной длины и нуклеотидного состава.

Для высокоспецифичной детекции точковых мутаций нами был предложен простой метод АС-ПЦР, основанный на использовании в качестве одного из АС-праймеров конъюгата олигонуклеотида с монометилловым эфиром полиэтиленгликоля (МПЭГ-5000, Shearwater Polymers, Inc.). При этом продукты ПЦР, соответствующие разным аллельным вариантам, имеют одинаковый нуклеотидный состав и длину, но существенно различаются по электрофоретической подвижности и легко детектируются при гель-электрофорезе.

Как было показано ранее, МПЭГ, присоединенный к олигонуклеотиду, практически не сказывается на его гибридизационных свойствах [5], но, будучи нейтральным соединением со значительной молекулярной массой (~5000 Да), приводит к существенному снижению электрофоретической подвижности конъюгата [6].

В качестве модели была выбрана мутация R408W гена фенилаланингидроксилазы человека (Phe-гидроксилаза, КФ 1.14.16.1), идентифицируемая в более 50% аллелей этого гена, обуславливающих фенилкетонурию в Западной Сибири [7]. В качестве матриц для АС-ПЦР использовали образцы ДНК больных фенилкетонурией и их родственников, содержащие мутацию R408W в гомо- или гетерозиготном состоянии. Мутация R408W гена Phe-гидроксилазы представляет собой замену С на Т, что соответствует замене G на A в комплементарной цепи. Так как неканоническое взаимодействие G и T достаточно сильно, возможно получение неспецифичных продуктов АС-ПЦР. Снизить эффект таких неканонических взаимодействий и обеспечить специфичность АС-ПЦР можно, вводя в последовательность праймеров нуклеотиды, некомплементарные геномной ДНК [8]. Мы предложили ввести в последовательность

АС-праймеров на расстоянии 3 нт от их 3'-концов разные для разных праймеров нуклеотиды, некомплементарные геномной ДНК. К 5'-концу праймера, соответствующего нормальному аллельному варианту, был ковалентно присоединен МПЭГ [6]. Праймер, комплементарный кодирующей цепи ДНК, был выбран таким образом, чтобы длина продукта ПЦР составила 540 нт.

АС-праймер для амплификации аллеля R408W+ (“мутация”) имел нуклеотидную последовательность $CTTTGCTGCCACAATAGCTT$, для амплификации нормального аллеля (“норма”) – МПЭГ- $CTTTGCTGCCACAATAACTC$, последовательность “общего” праймера – $GAGGTAACCCCTGTGATATCTTAAGGGC$. Каждый АС-праймер полностью комплементарен полученному с него продукту ПЦР, гибридизация с которыми поэтому происходит эффективнее, чем с геномной ДНК и с продуктами ПЦР, соответствующими другому АС-праймеру. Температура отжига праймеров, начиная с третьего цикла ПЦР, была на 1.5–2°C выше, чем на первых циклах. Это не сказывается на эффективности амплификации специфичных продуктов ПЦР, но эффективно препятствует амплификации неспецифичных продуктов, что позволяет использовать все три праймера в одной реакции.

Нами была показана высокая специфичность предложенного варианта АС-ПЦР в смесях, содержащих как один (рисунок, дорожки 1–6), так и оба АС-праймера (дорожки 7–9). Видно, что использование МПЭГ-содержащего праймера (дорожки 1, 2, 7, 8) не снижает специфичности метода и обеспечивает существенное изменение электрофоретической подвижности соответствующего продукта ПЦР, имеющего размер 540 п.о., аналогичное его удлинению на 80–90 п.о.

Таким образом, при оптимальном выборе олигонуклеотидных последовательностей АС-праймеров, предложенный нами подход позволяет идентифицировать любую точковую мутацию в гомо- и гетерозиготном состоянии по результатам гель-электрофореза продуктов ПЦР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобразования России, грант для поддержки НИР аспирантов вузов Минобразования России А03-2.12-633 и частично грантами программы МКБ Президиума РАН и грантами СО РАН № 126, 50 и Программой Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J. // Human Mutation. 2003. V. 22. P. 79–85.
2. McKinzie P.B., Parsons B.L. // Mutation Research. 2002. V. 517. P. 209–220.
3. Dutton C., Sommer S.S. // BioTechniques. 1991. V. 11. P. 700–702.

4. Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A., Sommer S.S. // *Genome Research*. 1997. V. 7. P. 389–398.
5. Bonora G.M., Ivanova E., Zarytova V., Burcovich B., Veronese F.M. // *Bioconjugate Chem.* 1997. V. 8. P. 793–797.
6. Пыиньий Д.В., Скобельцына Л.М., Гуцина Е.Н., Пыиная И.А., Шишкина И.Г., Дымищ Г.М., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М. // *Молекуляр. биология*. 2000. Т. 34. С. 984–997.
7. Смагулова Ф.О., Морозов И.В. // *Биоорганич. химия*. 2000. Т. 26. С. 838–843.
8. Патрушев Л.И., Зыкова Е.С., Каюшин А.Л., Коростелёва М.Д., Мирошников А.И. // *Биоорганич. химия*. 1998. Т. 24. С. 194–200.

Universal Method for SNP Identification

E. V. Brenner^{1,2#}, E. M. Ivanova², D. V. Pysnyi², and I. V. Morozov²

[#] Phone: +7 (3832) 30-4659; fax: +7 (3832) 33-3677; e-mail: brenner@niboch.nsc.ru

¹ Novosibirsk State University,

ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

A new approach to the identification of point mutations by allele-specific PCR was proposed. The mutation R408W of the human phenylalanine hydroxylase gene was used as a model. A high specificity of the approach was achieved by the use of primers partially complementary to the genomic DNA. Polyethylene glycol covalently attached to one of the allele-specific primers provides for the differential identification of the PCR products due to a change in electrophoretic mobility. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: allele-specific PCR, phenylketonuria, polyethylene glycol