



УДК 577.112.088.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА DSNP ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2005 г. И. М. Альтшулер*, П. А. Жулидов**, Е. А. Богданова**,
Н. Н. Мудрик**, Д. А. Шагин***

*ЗАО Евrogen, Москва;

**Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 07.04.2005 г. Принята к печати 30.05.2005 г.

Предложена модификация метода анализа однонуклеотидных полиморфизмов с помощью дуплекс-специфической нуклеазы краба (DSNP-метод, от duplex-specific nuclease preference). Метод использован для изучения точечных мутаций в генах человека: *kRAS*, *nRAS*, *hRAS*, *p53*, фактора свертываемости крови V, метилтетрагидрофолатредуктазы, протромбина, аполипопротеина E, а также делеции в гене *BRCA1*. Продемонстрирована возможность использования DSNP-метода для полуквантитативной оценки содержания мутантного аллеля в образце ДНК. Предложена система для одновременного определения нескольких близко расположенных однонуклеотидных полиморфизмов в гене *kRAS*. Разработанные подходы могут быть использованы при создании тест-систем для детекции однонуклеотидных полиморфизмов в генах человека.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, DSNP-метод, дуплекс-специфическая нуклеаза.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) играет важную роль при диагностике генетических заболеваний [1–4], в фармакогенетике [5–7], популяционной генетике [8, 9] и при генном картировании [4].

На сегодняшний день предложено значительное число методов анализа ОНП, основанных на выявлении различий в физико-химических свойствах фрагментов ДНК, несущих полиморфные участки (электрофоретическая подвижность в денатурирующих и неденатурирующих условиях, хроматографическая подвижность, различия по массе), или особенностей их взаимодействия со специальными зондами (флуоресцентными, люминесцентными, аллель-специфическими праймерами и т.д.) [10–14]. Многие методы адаптированы для анализа ОНП как в растворе, так и на твердой фазе [15, 16]. Как правило, методы анализа ОНП включают стадию предварительной

амплификации (обычно с помощью ПЦР) фрагментов ДНК, несущих полиморфные участки [10–14]. Преимущества и недостатки этих методов подробно обсуждены в ряде обзорных статей [10–14].

Ранее нами была охарактеризована новая нуклеаза из гепатопанкреаса камчатского краба, способная специфически расщеплять двухцепочечную ДНК и неактивная по отношению к одноцепочечной ДНК [17]. Мы назвали этот фермент дуплекс-специфической нуклеазой (ДСН). Было показано, что при использовании коротких двухцепочечных ДНК-субстратов эффективность ДСН-гидролиза совершенных (полностью комплементарных) ДНК-дуплексов значительно выше, чем несовершенных (содержащих по крайней мере одно неспаренное основание). Это свойство ДСН легло в основу нового метода анализа ОНП, который мы назвали DSNP-метод (от duplex-specific nuclease preference) [17].

DSNP-метод обладает несколькими преимуществами по сравнению с другими методами анализа ОНП. Во-первых, в качестве стартового материала для анализа можно использовать неочищенные продукты ПЦР. Для проведения анализа не требуется разделения, очистки и центрифугирования образцов ДНК. В целом анализ занимает 1 ч после получения продукта ПЦР. Во-вторых, метод DSNP позволяет анализировать оба аллеля гена одновременно в одной пробирке. В-третьих, специфический флуоресцентный сигнал, получаемый в процессе анализа, может быть визуализиро-

Сокращения: ДСН – дуплекс-специфическая нуклеаза; ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; DABCYL – 4-((4-диметиламино)фенил)азобензойная кислота; DSNP – анализ однонуклеотидных полиморфизмов с помощью дуплекс-специфической нуклеазы (от duplex-specific nuclease preference); FAM – 5-карбокситетрафлуоресцеин; FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции; TAMRA – 5-карбокситетраметилпродин; *MTHFR* – ген метилтетрагидрофолатредуктазы.

Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-70-56; эл. почта: shagdim@ibch.ru).

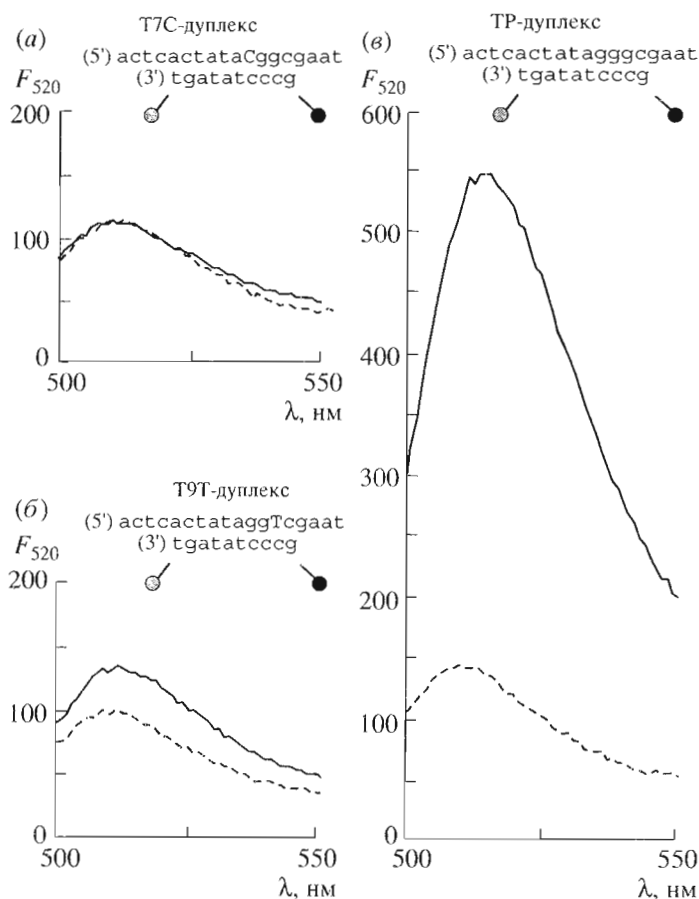


Рис. 1. Спектры флуоресценции несовершенных (*а, б*) и совершенного (*в*) ДНК-дуплексов, образованных сигнальной пробой FAM-(5')gcsctatagi-TAMRA и ДНК-мишенью, до (пунктирная линия) и после (сплошная линия) инкубации с дуплекс-специфической нуклеазой. Структуры ДНК-субстратов приведены над каждым спектром, черным кружком обозначен донор флуоресценции (FAM), серым кружком – тушитель флуоресценции (TAMRA).

ван при помощи стандартного лабораторного оборудования. Наконец, на основе DSNP-метода возможно создание микрочипов для анализа ОНП.

В настоящей работе мы предложили модификацию DSNP-метода, которая приводит к значительному снижению стоимости анализа. Кроме того, DSNP-метод был адаптирован для исследования ОНП в генах *kRAS*, *nRAS*, *hRAS*, фактора свертываемости крови *V (F5)*, метилтетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), протромбина (*F2*), аполипопротеина Е (*ApoE*), *p53* и делеции в гене *BRCA1* в гомозиготных и гетерозиготных геномах. На примере гена *kRAS* была продемонстрирована возможность одновременного определения нескольких точечных мутаций в одном фрагменте ДНК.

В некоторых случаях необходимо не только показать наличие или отсутствие ОНП в образце, но и определить количественное соотношение нормального и мутантного аллелей. Например, это важно при работе с образцами опухолевых тканей или при определении соотношения раз-

личных аллелей в суммарных образцах геномной ДНК от многих доноров [12]. В модельном эксперименте мы показали возможность полуколичественного определения содержания мутантного гена в сложном образце ДНК с помощью DSNP-метода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип DSNP-метода и его модификация

Анализ действия ДСН на синтетические олигонуклеотидные субстраты показал, что нуклеазная активность ДСН по отношению к 10-мерным совершенным (полностью комплементарным) ДНК-дуплексам значительно превышает активность в отношении несовершенных дуплексов (содержащих одну неспаренную нуклеотидную пару) той же длины. Это свойство ДСН продемонстрировано данными, представленными на рис. 1. ДНК-субстраты, образованные сигнальной пробой, меченой донором (5-карбоксифлуоресцеин, FAM) на 5'-конце и гасителем флуоресцен-

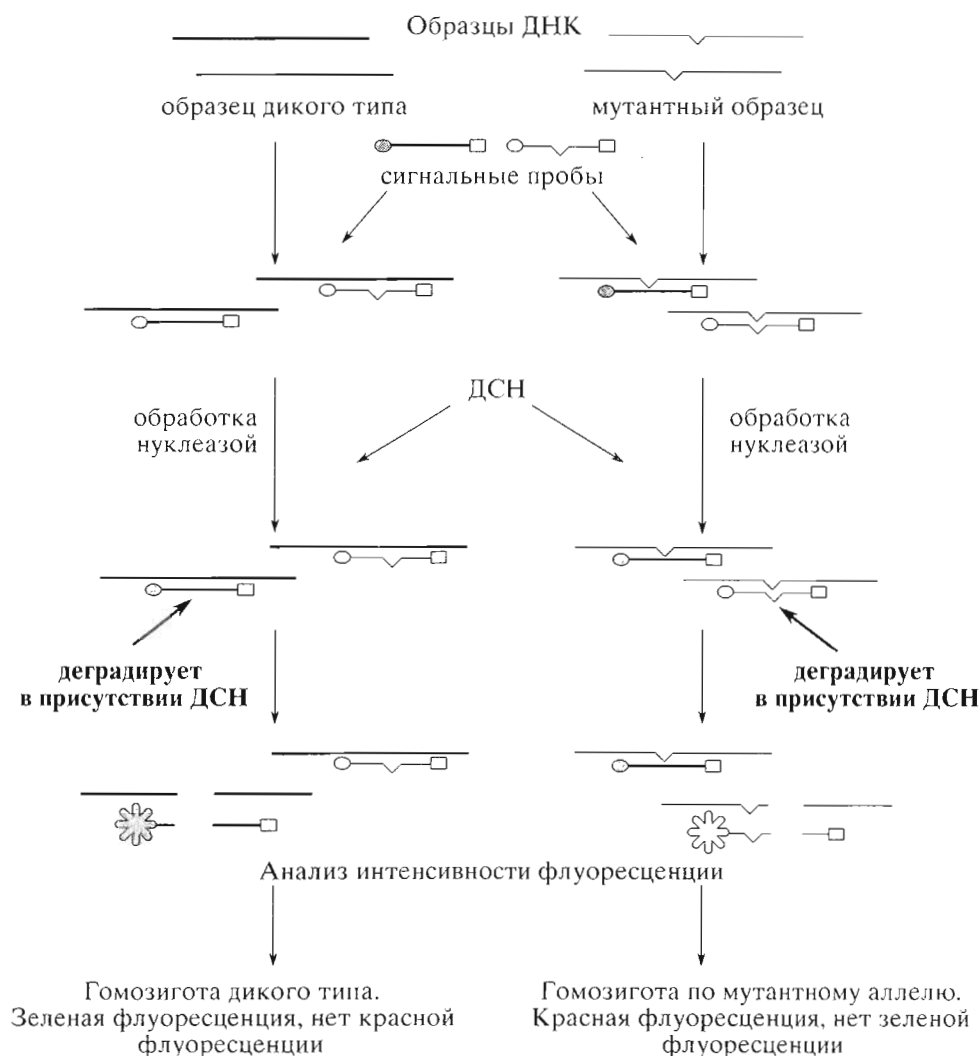


Рис. 2. Схема метода DSNP. Серые и незакрашенные кружки на конце сигнальных проб соответствуют первому и второму флуоресцентному донору, прямоугольник – тушителю флуоресценции. Неспаренная пара оснований обозначена галочкой. Серая и незакрашенная звездочки – зеленая и красная флуоресценция, возникающая после гидролиза сигнальных проб при обработке ДНК-дуплексов с помощью ДСН.

ции (5-карбокситетраметилродамин, TAMRA), и синтетическими ДНК, способными формировать с сигнальной пробой совершенные и несовершенные дуплексы, обрабатывали ДСН как описано в “Эксперимент. части”. Активность ДСН по отношению к субстрату оценивали по росту зеленой флуоресценции реакционной смеси, возникающей при гидролизе сигнальной пробы. Как видно из рис. 1, активность ДСН была обнаружена только в случае субстрата, содержащего совершенный ДНК-дуплекс.

Способность ДСН различать вариации в один нуклеотид в коротких ДНК-дуплексах легла в основу DSNP-метода.

Принцип метода изображен на рис. 2. Для анализа используют две сигнальные пробы – 10-мерные олигонуклеотиды, меченные на 5'-конце до-

нором флуоресценции, а на 3'-конце тушителем флуоресценции (FRET-меченные пробы, FRET от fluorescence resonance energy transfer, резонансный перенос энергии флуоресценции). Первая проба комплементарна последовательности ДНК дикого типа, вторая – мутантной последовательности. В случае гидролиза совершенного дуплекса, образованного сигнальной пробой и исследуемым фрагментом ДНК, каждая из сигнальных проб генерирует флуоресцентный сигнал специфической длины волны. В отсутствие гидролиза сигнальной пробы флуоресценция не наблюдается.

Фрагмент ДНК, содержащий исследуемый полиморфный участок, амплифицируют с помощью ПЦР. Затем аликвоту продукта ПЦР смешивают с сигнальными пробами и инкубируют в присутствии ДСН. В процессе инкубации ДСН ги-

дролит продукт ПЦР с образованием коротких фрагментов ДНК, способных к эффективной гибридизации с сигнальными пробами. При этом ДСН гидролизует также все совершенные дуплексы, образованные сигнальными пробами и фрагментами тестируемой ДНК, в результате чего генерируется специфический флуоресцентный сигнал.

В ранее описанном варианте метода [17] в реакционную смесь добавляли фрагмент Кленова, лишенный 5'-3'-экзонуклеазной активности. Реакцию проводили при температуре 30–35°C. За счет совместной активности фрагмента Кленова и ДСН происходило значительное увеличение концентрации ДНК-субстрата, способного к гибридизации с сигнальными пробами, что позволяло получать интенсивный флуоресцентный сигнал за относительно короткий промежуток времени.

В настоящей модификации мы отказались от использования фрагмента Кленова, добившись сравнимого эффекта за счет активности ДНК-полимеразы путем изменения температурного режима реакции. В предложенной модификации метода реакционную смесь инкубируют при 60°C в течение 5–10 мин. При этом происходит амплификация ДНК-субстрата за счет совместного действия ДСН и термостабильной ДНК-полимеразы (ДНК-полимераза попадает в реакционную смесь из неочищенного продукта ПЦР, используемого в качестве матрицы). ДСН расщепляет двуцепочечную ДНК, что приводит к появлению фрагментов ДНК, способных служить затравками для ДНК-полимеразы. Далее, реакционную смесь инкубируют при температуре 30–35°C, что обеспечивает гибридизацию сигнальных проб с фрагментами ДНК и продукцию (за счет активности ДСН) специфического флуоресцентного сигнала.

Новая модификация метода позволяет существенно снизить стоимость анализа за счет отказа от использования дорогостоящего фермента (фрагмента Кленова).

Влияние структуры сигнальных проб на специфичность DSNP-метода

Был проведен анализ влияния структуры сигнальных проб на специфичность и эффективность DSNP-метода. Для этого мы синтезировали набор 18-мерных олигонуклеотидных мишеней с вариациями одного нуклеотида в 10-нуклеотидном фрагменте и FRET-меченные 10-нуклеотидные сигнальные пробы, способные формировать с этими мишенями совершенные или несовершенные дуплексы (табл. 1). Было использовано два типа сигнальных проб: с 5-карбокситетраметилпроламином (TAMRA) или 4-((4-(диметиламино)фенил)азо)бензойной кислотой (DABCYL) в качестве тушителя флуоресценции. В обоих случа-

ях в качестве донора флуоресценции использовали FAM. Все возможные комбинации мишени и сигнальных проб были проверены в реакции с ДСН.

При использовании сигнальной пробы, меченой FAM-TAMRA, эффективность ДСН-гидролиза всех несовершенных дуплексов, оцененная по изменению уровня флуоресценции реакционной смеси, была более чем в 10 раз ниже, чем для совершенного дуплекса (табл. 1). Никакого предпочтительного положения неспаренной пары оснований (“ошибки”) отмечено не было. В случае пробы, меченой FAM-DABCYL, эффективность гидролиза дуплексов, содержащих “ошибку” вблизи 3'-конца сигнальной пробы, была лишь в 1.5–5 раз ниже, чем эффективность гидролиза совершенного дуплекса. Таким образом, было показано, что флуоресцентная метка, используемая для приготовления сигнальной пробы, влияет на эффективность ДСН-зависимой реакции в случаях, когда “ошибка” расположена вблизи 3'-конца ДНК-дуплекса.

Использование DSNP-метода для анализа ОНП в генах человека

DSNP-метод был использован для анализа ОНП в генах человека, вовлеченных в развитие ряда заболеваний или определяющих предрасположенность к их возникновению (табл. 2). Указанные мутации в генах *F2* и *F5* влияют на свертываемость крови [18, 19], полиморфизм *C677T* в гене *MTHFR* приводит к нарушениям в развитии нервной системы [20], вариации в гене *ApoE* связаны с развитием болезни Альцгеймера [21], мутации в генах *RAS* [22, 23], *p53* [24], *BRCA1* [25] связаны с развитием различных онкологических заболеваний.

В каждом случае для амплификации фрагмента ДНК гена, содержащего полиморфный участок, были синтезированы пары специфических олигонуклеотидных праймеров (табл. 2) и подобраны сигнальные пробы, обеспечивающие однозначное определение мутантного аллеля и аллеля дикого типа (табл. 3). В каждом случае сигнальная проба, специфическая для аллеля дикого типа содержала FAM в качестве донора флуоресценции и генерировала после гидролиза зеленый флуоресцентный сигнал (максимум эмиссии 520 нм при длине волны возбуждения 480 нм). Сигнальные пробы, специфические для мутантных аллелей, содержали TAMRA в качестве донора флуоресценции и генерировали после гидролиза красный флуоресцентный сигнал (максимум эмиссии 590 нм при длине волны возбуждения 560 нм). В качестве тушителя флуоресценции во всех случаях был использован DABCYL. Структуры олигонуклеотидных праймеров и сигнальных проб приведены в разделе “Эксперимент. часть”.

Таблица 1. Сравнение действия ДСН на совершенные и несовершенные ДНК-дуплексы*

Название дуплекса	Последовательность ДНК-мишени** 5'-3'	$\Delta F_m/\Delta F_p^{***}$ для сигнальной пробы:	
		FAM-(5')gcctatagt-TAMRA	FAM-(5')gcctatagt-DABCYL
TP	actca <u>ctata</u> gggcgaat	1.00	1.00
T1C	actc <u>C</u> ctatagggcgaat	0.04	0.48
T1G	actc <u>G</u> ctatagggcgaat	0.04	0.25
T1T	actc <u>T</u> ctatagggcgaat	0.04	0.42
T2A	actca <u>A</u> tatagggcgaat	0.05	0.36
T2G	actca <u>G</u> atatagggcgaat	0.02	0.46
T2T	actca <u>T</u> tatagggcgaat	0.02	0.24
T3A	actcac <u>A</u> atagggcgaat	0.02	0.27
T3C	actcac <u>C</u> atagggcgaat	0.01	0.09
T3G	actcac <u>G</u> atagggcgaat	0.02	0.22
T4C	actca <u>ct</u> Ctagggcgaat	0.02	0.10
T4G	actca <u>ct</u> Gtagggcgaat	0.03	0.18
T4T	actca <u>ct</u> Ttagggcgaat	0.03	0.18
T5A	actca <u>cta</u> Aagggcgaat	0.01	0.11
T5C	actca <u>cta</u> Cagggcgaat	0.03	0.14
T5G	actca <u>cta</u> Gagggcgaat	0.02	0.13
T6C	actca <u>ctat</u> Cgggcgaat	0.06	0.14
T6G	actca <u>ctat</u> Ggggcgaat	0.04	0.16
T6T	actca <u>ctat</u> Tgggcgaat	0.01	0.22
T7A	actca <u>ctata</u> Aggcgaat	0.03	0.07
T7C	actca <u>ctata</u> Cggcgaat	0.01	0.10
T7T	actca <u>ctata</u> Tggcgaat	0.06	0.09
T8A	actca <u>ctatag</u> Agcgaat	0.04	0.06
T8C	actca <u>ctatag</u> Cgcgaat	0.05	0.01
T8T	actca <u>ctatag</u> Tgcgaat	0.06	0.05
T9A	actca <u>ctatagg</u> Acgaat	0.05	0.03
T9C	actca <u>ctatagg</u> Ccgaat	0.08	0.03
T9T	actca <u>ctatagg</u> Tcgaat	0.07	0.03
T10A	actca <u>ctatagg</u> Agaat	0.03	0.03
T10G	actca <u>ctatagg</u> Ggaat	0.07	0.08
T10T	actca <u>ctatagg</u> Tgaat	0.05	0.15

* Дуплексы образованы 10-мерной сигнальной пробой и 18-мерным синтетическим олигонуклеотидом.

** Последовательность, комплементарная сигнальной пробе, подчеркнута; "ошибка" отмечена заглавной буквой жирным шрифтом.

*** Приведены значения изменения флуоресценции тестируемых несовершенных дуплексов ΔF_m по отношению к изменениям флуоресценции совершенного дуплекса ΔF_p .

Наборы олигонуклеотидных праймеров и сигнальных проб были проверены в модельных экспериментах с использованием образцов ДНК, полученных от гомозиготных и гетерозиготных по данному аллелю доноров и/или синтетических 60-мерных олигонуклеотидных субстратов.

Для ОНП-анализа в генах протромбина, *MTHFR*, *F5* и *BRCA1* в качестве матрицы для

ПЦР использовали образцы геномной ДНК (образцы были предоставлены проф. А.В. Терских и проф. А.Г. Татосьяном) и синтетические 60-мерные олигонуклеотиды, содержащие те же полиморфные участки. Амплификацию ДНК проводили с использованием специфических праймеров и гибридизовали с сигнальными пробами в присутствии ДСН.

Таблица 2. Результаты DSNP-анализа с двумя флуоресцентными красителями для детекции ОНП в генах, связанных с некоторыми заболеваниями человека

Ген	ОНП	Сигнальные пробы	F_{520}/F_{590} в образцах ДНК		
			гомозиготный по дикому типу	гетерозиготный	гомозиготный по мутантному типу
<i>kRAS</i>	G35A	kRAS-34/35wt kRAS-G35A	744/54	567/611	52/798
	G35T	kRAS-34/35wt kRAS-G35T	756/63	617/591	61/753
	G34A	kRAS-34/35wt kRAS-G34A	750/56	507/548	56/658
	G38A	kRAS-38wt kRAS-G38A	472/48	354/360	54/421
<i>nRAS</i>	G34A	nRAS-34/35wt nRAS-G34A	724/67	633/704	42/873
	G35C	nRAS-34/35wt nRAS-G35C	790/52	629/689	71/853
	G35A	nRAS-34/35wt nRAS-G35A	773/66	600/675	54/799
<i>hRAS</i>	G35T	hRAS-35wt hRAS-G35T	594/68	469/536	49/555
<i>F5</i>	G1698A (Leiden)	FVLeidenNorm FVLeidenMut	431/42	346/383	51/436
<i>MTHFR</i>	C677T	MT677N MT677Mut	421/56	257/318	50/396
<i>F2</i>	G20210A	ProtN ProtMut	407/45	310/272	38/340
<i>ApoE</i>	C388T	ApoE-388wt ApoE-C388T	258/21	189/201	27/266
<i>BRCA1</i>	5382insC	BRCA-wt BRCA-5382insC	390/63	317/480	57/591
<i>p53</i>	C309T	p53-wt p53Mut	415/51	355/325	44/580

F_{520} – интенсивность флуоресценции FAM при длине волны возбуждения 480 нм, эмиссии – 520 нм, F_{590} – интенсивность флуоресценции TAMRA при длине волны возбуждения 560 нм, эмиссии – 590 нм; wt – аллель дикого типа.

Так как результаты DSNP-анализа в случае синтетических ДНК-субстратов не отличались от результатов, полученных на геномной ДНК (данные не приведены), был сделан вывод о возможности использования синтетических субстратов в модельных экспериментах в случаях, когда образцы геномной ДНК, гомозиготные по мутантному аллелю, были недоступны.

Результаты модельных экспериментов (табл. 2) показывают, что DSNP-метод позволяет надежно различать мутантные аллели и аллели дикого типа как в гомозиготных, так и в гетерозиготных образцах. Кроме того, на примере полиморфизма

5382insC в гене *BRCA1* показано, что DSNP-метод позволяет определять не только точечные замены, но и точечные делеции и инсерции в генах. Следует обратить внимание на то, что для исследования различных мутаций использовали стандартные условия реакции. Это позволяет говорить об универсальности метода DSNP для широкого спектра мутаций.

Анализ близкорасположенных точечных мутаций

В литературе описан ряд случаев возникновения нескольких точечных мутаций на ограничен-

Таблица 3. Специфичность DSNP-анализа при одновременной детекции нескольких мутаций в одном фрагменте ДНК гена *kRAS*

Аллель	Сигнальные пробы	F_{520}	F_{590}
Дикий тип	kRAS-34/35wt; kRAS-G35A; kRAS-G35T; kRAS-G34A	754	98
<i>kRAS</i> -G35A	kRAS-34/35wt; kRAS-G35A	63	776
<i>kRAS</i> -G35T		45	42
<i>kRAS</i> -G34A		70	58
<i>kRAS</i> -G35A	kRAS-34/35wt; kRAS-G35T	70	63
<i>kRAS</i> -G35T		85	853
<i>kRAS</i> -G34A		74	50
<i>kRAS</i> -G35A	kRAS-34/35wt; kRAS-G34A	78	67
<i>kRAS</i> -G35T		62	62
<i>kRAS</i> -G34A		88	698

F_{520} – интенсивность флуоресценции FAM при длине волны возбуждения 480 нм, эмиссии – 520 нм, F_{590} – интенсивность флуоресценции TAMRA при длине волны возбуждения 560 нм, эмиссии – 590 нм. wt – аллель дикого типа. Жирным шрифтом выделены значения флуоресценции в тех пробах, в которых флуоресцентный зонд образует совершенный дуплекс с анализируемым фрагментом ДНК.

ном участке ДНК [26, 27]. Большинство существующих методов анализа ОНП не позволяют проводить точное определение таких близкорасположенных мутаций.

Мы продемонстрировали, что DSNP-метод можно успешно использовать для типирования близкорасположенных точечных мутаций, а также для тестирования множественных аллелей гена. В качестве модельного объекта был выбран ген *kRAS*, для которого описано несколько мутаций в положениях 34 и 35: G34A, G35A или G35T [22].

В первом эксперименте фрагмент ДНК, соответствующий аллелю дикого типа, был использован для DSNP-анализа с двумя сигнальными пробами (проба на дикий тип и на один из мутантных аллелей, результаты измерений представлены в табл. 2). DSNP-анализ с четырьмя сигнальными пробами (на *kRAS* дикого типа и на мутантные аллели G34A, G35A и G35T) дал схожий результат (табл. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что одновременное добавление в реакционную смесь всех четырех сигнальных проб не приводит к изменению специфичности анализа.

В дальнейших экспериментах для DSNP-анализа были использованы четыре аллельных варианта гена *kRAS*: один – дикого типа и три мутантных – G34A, G35A или G35T, а также четыре соответствующие сигнальные пробы. Было показано, что флуоресцентный сигнал возникает только в том случае, когда сигнальная проба полностью комплементарна тестируемой последовательности (табл. 3).

В наших экспериментах мы использовали ДНК-зонды с двумя типами флуоресцентных красителей. Синтез зондов на основе большего числа флуоресцентных меток даст возможность с помо-

щью DSNP-метода определять одновременно несколько точечных мутаций в одном фрагменте ДНК. Это, в свою очередь, позволит значительно снизить цену и трудозатраты анализа, что, несомненно, является важным в случае массовых ОНП-скринингов.

Полуколичественный DSNP-анализ

В некоторых случаях бывает важно определить количественное соотношение мутантного и нормального аллелей в образце. Например, возникновение точечной мутации в гене *kRAS* в 12-м кодоне свидетельствует о перерождении клетки в опухолевую и используется, в частности, как диагностический признак при раннем определении рака прямой кишки. Количественная оценка доли мутантного аллеля имеет значение для установления стадии заболевания [28]. Мы разработали метод полуколичественного DSNP-анализа и продемонстрировали его эффективность на примере анализа полиморфизма G35A в гене *kRAS*.

Два синтетических фрагмента ДНК длиной 60 п.о., один из которых содержал последовательность дикого типа гена *kRAS*, а другой – мутацию G35A, были использованы в качестве матрицы для ПЦР. Продукты ПЦР, выравненные по концентрации, смешивали в различных пропорциях (содержание мутантного аллеля – 25, 50 и 75%) и реамплифицировали. Образцы инкубировали в присутствии соответствующих сигнальных проб и ДСН в течение 10 мин при 60°C, а затем при 35°C в течение различных промежутков времени. Полученные зависимости роста флуоресценции F_{590} (флуоресценция, продуцируемая в результате гидролиза пробы на мутантный аллель) от време-

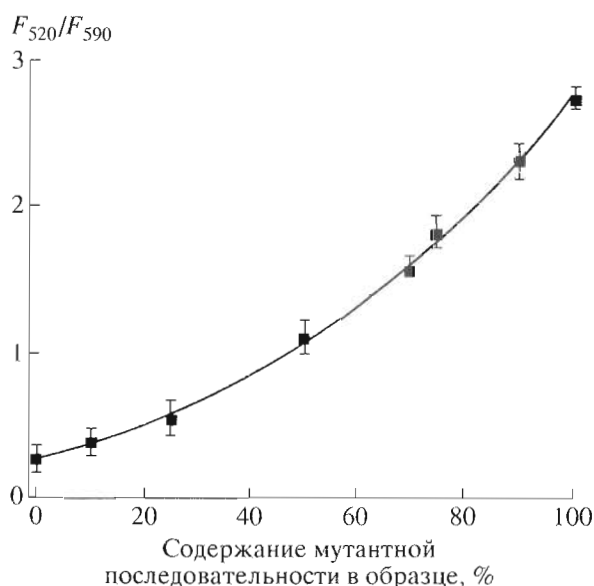


Рис. 3. Зависимость величины F_{520}/F_{590} от количественного соотношения нормального и мутантного аллелей в образце ДНК. F_{520} и F_{590} — флуоресценция реагентов FAM и TAMRA. График построен на основании 5 независимых серий экспериментов.

ни инкубации свидетельствуют, что максимальный уровень сигнала достигается через 30 мин инкубации и пропорционален содержанию мутантной ДНК в образце (данные не приведены).

После оптимизации условий реакции были построены графики зависимости величины F_{520}/F_{590} от количественного соотношения нормального и мутантного аллелей в образце (рис. 3). Величина F_{520}/F_{590} представляет собой отношение значений интенсивности флуоресценции, продуцируемой сигнальными пробами (F_{520} — флуоресценция реагента FAM и F_{590} — флуоресценция реагента TAMRA). Эта величина не зависит от абсолютного количества ДНК-мишени в образце и отражает относительное содержание мутантного аллеля. Нелинейный характер полученной зависимости связан с тем, что при полном гидролизе разных сигнальных проб продуцируется флуоресцентный сигнал различной интенсивности.

Полученный график может быть использован в качестве калибровочной кривой для определения процентного содержания нормального и мутантного аллелей в реальном образце ДНК с точностью до 10%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для анализа субстратной специфичности ДСН использовали синтетические субстраты, образованные 10-мерными сигнальными пробами, имеющими на 5'-конце флуоресцентную метку (FAM), а на 3'-конце тушитель флуоресценции (TAMRA или

ДАВСУЛ), и немечеными 18-мерными олигонуклеотидами, способными формировать совершенные и несовершенные дуплексы с сигнальными пробами. Структуры использованных олигонуклеотидных субстратов приведены в табл. 1. Для получения двуцепочечного субстрата сигнальные пробы и немеченые олигонуклеотиды смешивали в эквимольных количествах.

Реакцию с ДСН проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей ДСН-буфер (5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ Трис-НСl pH 7.8), ДСН (0.6 ед. акт., Евrogen, Россия), 0.3 мкМ ДНК-субстрат. Реакционную смесь инкубировали при 30°C в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 500 мМ раствора EDTA. Активность фермента оценивали по изменению флуоресценции реакционной смеси по окончании инкубации. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия).

Аmplификация образцов ДНК для DSNP-анализа. Образцы очищенной геномной ДНК были предоставлены проф. А.В. Терских (Stanford University School of Medicine, Department of Pathology, Beckman Center, Stanford, USA) и проф. А.Г. Татояном (Институт канцерогенеза РАМН, Москва). 60-мерные синтетические олигонуклеотиды были синтезированы компанией "Евrogen". Для амплификации фрагментов генов, содержащих полиморфные участки, использовали набор реактивов Advantage 2 PCR Kit (BD Bioscience, США). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей Advantage 2 Polymerize mix (BD Bioscience), 200 мкМ dNTP, 0.3 мкМ каждого специфического олигонуклеотидного праймера и 10 нг геномной ДНК человека. ПЦР проводили в следующих условиях: 95°C — 7 с; 65°C — 20 с; 72°C — 20 с, 30 циклов. Ниже приведены олигонуклеотидные праймеры, использованные в ПЦР:

1. **p53** (С309Т полиморфизм): 5'-aaggggagcctcaccacg-3' и 5'-ccacgatctgaagggtgaa-3';
2. **Протромбин** (G20210А полиморфизм): 5'-atggtcccaataaaagtac-3' и 5'-aatagcactgggagcattga-3'.
3. **MTHFR** (С677Т полиморфизм): 5'-cttgaagagaaggtgtctg-3' и 5'-aagaaagctgcgtgatgatg-3'.
4. **kRas** (G34А, G35Т, G35А, G38А полиморфизмы): 5'-tataactgtgtagttggag-3' и 5'-ctgtatctcaagcactct-3'.
5. **nRas** (G34А, G35С, G35А полиморфизмы): 5'-ctgaglacaaactggtggtg-3' и 5'-gctgattgctcagtcgctt-3'.
6. **hRas** (G35Т полиморфизм): 5'-cggaatataagctgggtg-3' и 5'-gatggtcagcgcactctgtg-3'.
7. **Аполипопротеин Е** (С388Т полиморфизм): 5'-ggcctgcacctgcgcccggta-3' и 5'-gctgacatggaggacgt-3'.
8. **Фактор свертываемости крови V** (G1698А полиморфизм): 5'-tactaatctgtaagagcagatc-3' и 5'-gttactcaaggacaataacc-3'.

9. **BRCA1** (5382insC полиморфизм): 5'-gccccct-gaagatctttctg-3' и 5'-ccaaggtccaagcgagca-3'.

Для получения образцов с различным содержанием мутантного аллеля (полиморфизм G35A) гена *kRAS* продукты ПЦР с синтетических субстратов смешивали в соответствующих пропорциях. Полученные смеси реамплифицировали как описано выше.

DSNP-анализ. Продукт ПЦР (5 мкл реакционной смеси, содержащей приблизительно 75–100 нг ДНК) смешивали с 1.5 мкл 10-кратного ДСН-буфера (50 mM MgCl₂, 100 mM Трис-НСl pH 7.8), сигнальными пробами (до конечной концентрации пробы 0.3 мкМ), ДСН (0.6 ед. акт., Евроген) и доводили объем реакционной смеси до 15 мкл, добавляя деионизованную воду. Смесь инкубировали 10 мин при 65°C, а затем 40 мин при 35°C. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian) и на фотометре-флуориметре ФФМ-01 (Кортэк, Россия).

Сигнальные пробы, специфичные к аллелям дикого типа, содержали на 5'-конце FAM в качестве донора флуоресценции, а специфичные к мутантным аллелям – TAMRA. В качестве тушителя флуоресценции использовали DABCYL (на 3'-конце). Использовали следующие сигнальные пробы:

1. **p53** (C309T полиморфизм):

p53WT – 5'-FAM-tgggcagtgc-DABCYL-3'

p53Mut – 5'-TAMRA-tggacagtgc-DABCYL-3'

2. **Прогромбин** (G20210A полиморфизм):

ProtN – 5'-FAM-gctcgtgag-DABCYL-3'

ProtMut – 5'-TAMRA-gcttgctgag-DABCYL-3'

3. **MTHFR** (C677T полиморфизм):

MT677N – 5'-FAM-tcggtcccg-DABCYL-3'

MT677Mut – 5'-TAMRA-tcgactcccg-DABCYL-3'

4. **BRCA1** (5382insC полиморфизм):

BRCA-wt – 5'-FAM-aatcccagga-DABCYL-3'

BRCA-5382insC – 5'-TAMRA-aatcccagg-DABCYL-3'

5. **Аполипопротеин Е** (C388T полиморфизм):

ApoE-388wt – 5'-FAM-cgtgcgcgcg-DABCYL-3'

ApoE-C388T – 5'-TAMRA-cgtgtgcgcg-DABCYL-3'

6. **kRAS** (G34A, G35T, G35A, G38A полиморфизмы):

kRAS-34/35wt – 5'-FAM-gctggtggcg-DABCYL-3'

kRas-G35A – 5'-TAMRA-gctgatggcg-DABCYL-3'

kRas-G35T – 5'-TAMRA-gctgtggcg-DABCYL-3'

kRas-G34A – 5'-TAMRA-gctagtggcg-DABCYL-3'

kRas-G38A – 5'-TAMRA-ggtgacgtag-DABCYL-3'

7. **nRas** (G34A, G35C, G35A полиморфизмы):

nRAS-34/35wt 5'-FAM-ccactgctc-DABCYL-3'

nRAS-G35A 5'-TAMRA-ccatctgctc-DABCYL-3'

nRAS-G35C 5'-TAMRA-ccagctgctc-DABCYL-3'

nRAS-G34A 5'-TAMRA-ccactgctc-DABCYL-3'

8. **hRas** (G35T полиморфизм):

hRAS-35wt 5'-FAM-accgccggcg-DABCYL-3'

hRAS-G35T 5'-TAMRA-accgacggcg-DABCYL-3'

9. **Фактор свертываемости крови V** (G1698A полиморфизм):

FVLeidenNorm 5'-TAMRA-tcctcgctg-DABCYL-3'

FVLeidenMut 5'-FAM-tcctcgctg-DABCYL-3'

Полуколичественное определение проводилось в стандартных условиях. Интенсивность флуоресценции измерялась на фотометре-флуориметре ФФМ-01 (Кортэк, Россия).

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим проф. А.В. Терских за продуктивное обсуждение работы и предоставленные образцы ДНК, а также проф. А.Г. Татосяну за предоставленные образцы ДНК. Работа была поддержана ЗАО Евроген.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Risch N., Merikangas K. // *Science*. 1996. V. 273. P. 1516–1517.
2. Brookes A.J. // *Gene*. 1999. V. 234. P. 177–186.
3. Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Shaw N., Lane C.R., Lim E.P., Kalyanaram N., Nemesh J., Ziaugra L., Friedland L., Rolfe A., Warrington J., Lipshutz R., Daley G.Q., Lander E.S. // *Nat. Genet.* 1999. V. 22. P. 231–238.
4. Kruglyak L. // *Nat. Genet.* 1999. V. 22. P. 139–144.
5. McCarthy J.I., Hilfiker R. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. P. 505–508.
6. Housman D., Ledley F.D. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 492–493.
7. Roses A.D. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. P. 2261–2267.
8. Nielsena R. // *Genetics*. 2000. V. 154. P. 931–942.
9. Hacia J.G., Fan J.B., Ryder O., Jin L., Edgemon K., Ghandour G., Mayer R.A., et al. // *Nat. Genet.* 1999. V. 22. P. 164–167.
10. Landegren U., Nilsson M., Kwok P.Y. // *Genome Res.* 1998. V. 8. P. 769–776.
11. Kwok P.Y., Ming X. // *Human Mutation*. 2004. V. 23. P. 442–446.
12. Syvanen A.C., Taylor G.R. // *Human Mutation*. 2004. V. 23. P. 401–405.
13. Kwok P.Y. // *Pharmacogenomics*. 2000. V. 1. P. 95–100.
14. Syvanen A.C. // *Nat. Rev. Genet.* 2001. V. 2. P. 930–942.
15. Huang J.X., Mehrens D., Wiese R., Lee S., Tam S.W., Daniel S., Gilmore J., Shi M., Lashkari D. // *Clinical Chemistry*. 2001. V. 47. P. 1912–1916.
16. Wakai J., Takagi A., Nakayama M., Miya T., Miyahara T., Iwanaga T., Takenaka S., Ikeda Y., Amano M. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 141.
17. Shagin D.A., Rebrikov D.V., Kozhemyako V.B., Altshuler I.M., Shcheglov A.S., Zhulidov P.A., Bogdano-

- va E.A., Staroverov D.B., Rasskazov V.A., Lukyanov S. // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 1935–1942.
18. Langan R.C. // *J. Am. Board Fam. Pract.* 2004. V. 17. P. 306–308.
19. Kurata M., Horii I. // *J. of Toxicological Sciences.* 2004. V. 29. P. 13–32.
20. Kirke P.N., Mills J.L., Molloy A.M., Brody L.C., O'Leary V.B., Daly L., Murray S., Conley M., Mayne P.D., Smith O., Scott J.M. // *BMJ.* 2004. V. 328. P. 1535–1536.
21. Itzhaki R. // *Herpes.* 2004. V. 11. Suppl. 2. P. 77A–82A.
22. Mu D.Q., Peng Y.S., Xu Q.J. // *World J. Gastroenterol.* 2004. V. 10. P. 471–475.
23. Yoshida T., Ohnami S., Aoki K. // *Cancer Sci.* 2004. V. 95. P. 283–289.
24. Mesaeli N., Phillipson C. // *Molecular Biology of the Cell.* 2004. V. 15. P. 1862–1870.
25. Thull D.L., Vogel V.G. // *The Oncologist.* 2004. V. 9. P. 13–24.
26. Tsun L.C., Wei Z., Suet Y.L., Siu T.Y. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 4878–4881.
27. Stewart C.A., Horton R., Allcock R.J.N., Ashurst J.L., Atrazhev A.M., Coggill P., Dunham J., et al. // *Genome Res.* 2004. V. 14. P. 1176–1187.
28. Itabashi T., Maesawa C., Uchiyama M., Higuchi T., Masuda T. // *Int. J. Oncol.* 2004. V. 24. P. 687–696.

Application of the Duplex-Specific Nuclease Preference Method to the Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Human Genes

I. M. Altshuler*, P. A. Zhulidov**, E. A. Bogdanova**,
N. N. Mudrik**, and D. A. Shagin***

Phone/fax: +7 (095) 330-7056, e-mail: shagdim@ibch.ru

*ZAO Evrogen, Moscow, Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A new modification of the single nucleotide polymorphism (SNP) analysis (DSNP, duplex-specific nuclease preference) method using the duplex-specific nuclease from the king crab was proposed. The method was used to study SNPs in the following human genes: *kRAS*, *nRAS*, *hRAS*, and *p53*, the genes of blood coagulation factor V, methyltetrahydrofolate reductase, prothrombin, and apolipoprotein E and a deletion in the *BRCA1* gene. DSNP was shown to be useful for the estimation of the mutant allele content in DNA samples. A system for the simultaneous identification of several adjacent single-nucleotide polymorphisms in the *kRAS* gene was proposed. The approaches could be used to develop test systems for the detection of SNPs in human genes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: DSNP method, duplex-specific nuclease, single-nucleotide polymorphism