

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.151.5-072.7

В.В. Красицкая¹, Т.Н. Субботина^{2,3}, И.А. Ольховский^{2,4}, Л.А. Франк^{1,3}**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ ЛЕЙДЕНА МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО УДЛИНЕНИЯ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНОГО ПРАЙМЕРА С ДВОЙНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ (PED-БИОЛЮМ)**¹ФГБУН Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск; ²Красноярский филиал ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава РФ, 660036, Красноярск; ³ФГАОУ ВПО Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск; ⁴ФГБУН КНЦ СО РАН, 660036, Красноярск

Проведено сравнение метода выявления мутации Лейдена на основе PEXT реакции с последующим биолюминесцентным микроанализом продуктов [1] с методом на основе ПЦР-РВ. Для тестирования были отобраны 83 образца геномной ДНК, в том числе 35 с известной гетерозиготной мутацией Лейдена. В качестве теста сравнения использовался коммерческий набор «SNP-экспресс-РВ» (НПО «Литех»). Показано, что предложенный подход представляет собой простой в исполнении, эффективный и относительно недорогой метод определения однонуклеотидного полиморфизма Лейдена в гене V фактора свертывания крови. Метод «PED-Биолюм» не отличается от коммерческого метода ПЦР-РВ по способности выявления мутантного аллеля и не уступает параметрам экономической эффективности.

Ключевые слова: выявление SNP, мутация Лейдена, PEXT-реакция, фотопротейин обелин, биолюминесцентный микроанализ

*V.V. Krasitskaya, T.N. Subbotina, I.A. Olkhovskiy, L.A. Frank***THE DETECTION OF LEIDEN MUTATION USING TECHNIQUE OF ENZYMATIC EXTENSION OF ALLELE-SPECIFIC PRIMER WITH DOUBLE BIOLUMINESCENT DETECTION (PED-BIOLUM)**

The article deals with comparing technique of detection of Leiden mutation on the basis of PEXT-reaction with subsequent bioluminescent microanalysis of products with technique based on RT-PCR. The sampling for testing comprised 83 specimen of genome DNA including 35 specimens with known Leiden heterozygote mutation. The commercial kit "SNP-express-PV" (Litex) was used as a comparison test. It is demonstrated that proposed approach is a simple in its application, effective and relatively inexpensive technique of detection of Leiden one-nucleotide polymorphism in gene V of blood coagulation factor. The technique "PED-Biolum" has no differences in comparison with commercial technique RT-PCR concerning ability to detect mutant allele and matches it in parameters of economic effectiveness.

Key words: detection SNP, Leiden mutation, reaction PEXT, photoprotein obelin, bioluminescent microanalysis

Однонуклеотидная замена (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) в гене проакцелерина – пятого коагуляционного фактора (FV) по сайту 1691 G→A (R506Q) (dbSNP: rs6025), известная как мутация Лейдена, придает устойчивость активной форме фактора V к протеолитическому действию активированного протеина C и является наиболее клинически значимым полиморфизмом плазменного гемостаза. Наличие мутации Лейдена в 3,7 раза повышает риск тромбоза глубоких вен [2], в 1,5 раза увеличивает риск развития инфаркта, в том числе в 2,8 раза у лиц без выраженного коронарного стеноза [3]. Носительство данной мутации повышает вероятность развития целого ряда осложнений беременности [4–6]. Экспертами ВОЗ носительство мутации Лейдена признано абсолютным противопоказанием к назначению оральных контрацептивов [7].

Для выявления мутации Лейдена используют различные методы (аллель-специфическую гибридизацию, лигирование олигонуклеотидных фрагментов, рестриктазный анализ, реакцию удлинения праймера, различные модификации ПЦР и др. [8]. В качестве альтернативного варианта предложена

аналитическая технология, основанная на ферментативном удлинении аллель-специфического праймера (primer extension reaction, PEXT-реакция) с последующей детекцией продуктов реакции с помощью биолюминесцентных меток на основе кальцийзависимых фотопротейинов (PED-Биолюм) [1]. Как было показано ранее, молекулярный анализ с использованием фотопротейинов в качестве репортерных молекул отличается высокой чувствительностью и простотой, метки на основе фотопротейинов доступны и стабильны [9]. На основе двух генетических вариантов фотопротейина обелина, существенно различающихся по цвету и кинетике биолюминесцентных сигналов, был разработан метод одновременного анализа двух мишеней в одном образце [10, 11].

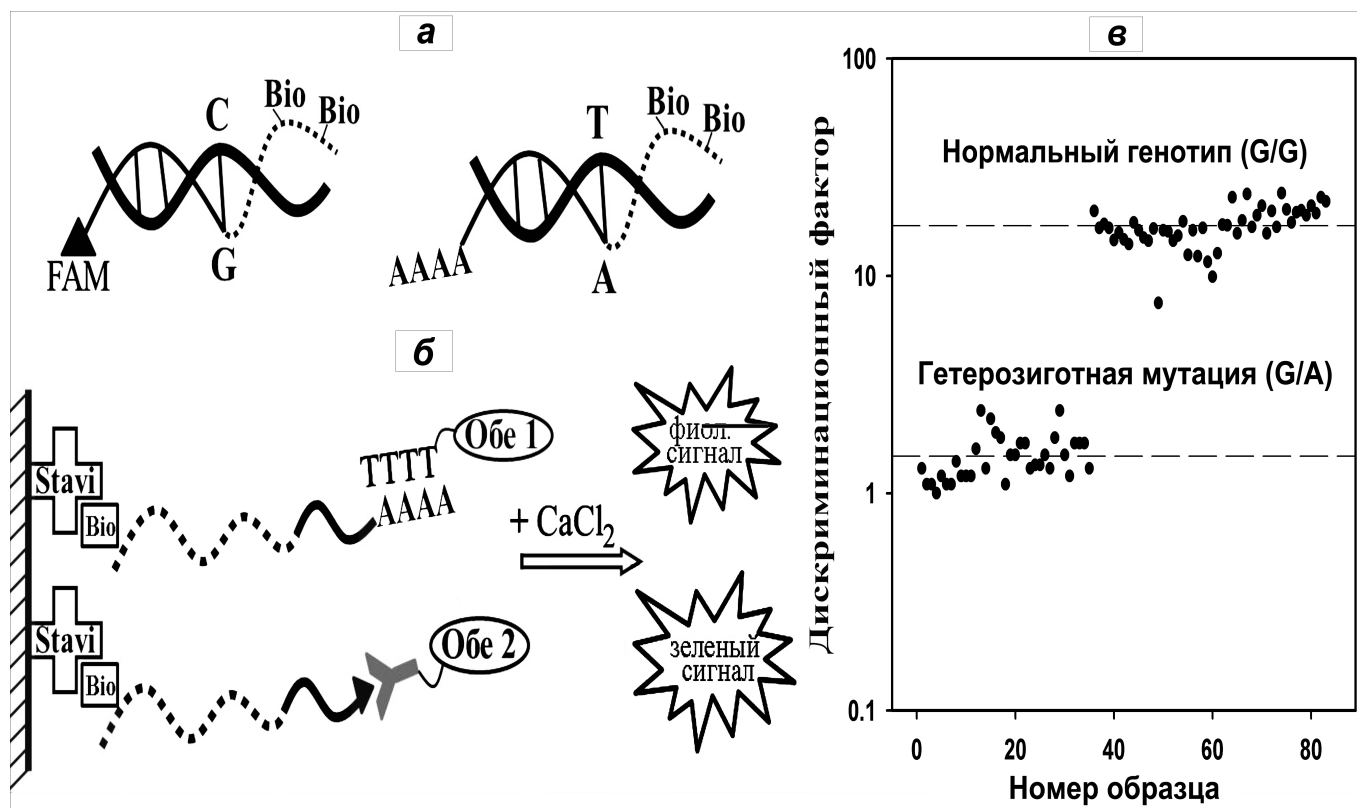
Целью работы явилась апробация и оценка аналитических и экономических характеристик разработанного одно-временного метода PED-Биолюм в практике рутинного лабораторного тестирования.

Материалы и методы. В настоящее исследование были включены пробы биоматериала, собранные в рамках межцентрового исследования "Генетические факторы риска тромбоза у жителей, проживающих на территории РФ, клиническое фенотипирование и тромбопрофилактика тромбоэмболических осложнений в онтогенезе" [12]. Вы-

Для корреспонденции:

Ольховский Игорь Алексеевич, канд. мед. наук, доц., дир. филиала
Адрес: 660036, Красноярск, Академгородок, 15а
E-mail: krashemcenter@mail.ru

См. продолжение на с. 39



Выявленные мутации Лейдена на основе РЕХТ-реакции.

a – продукты РЕХТ-реакции нормального (слева) и мутантного (справа) аллелей; *б* – твердофазный биоломинесцентный микроанализ продуктов РЕХТ-реакции. Stavi – стрептавидин; Bio – остаток биотина; Обе1, Обе2 – репортерные белки, мутантные производные фотопотеина обелина; *в* – результаты генотипирования полиморфизма 1691 G→А гена FV (мутация Лейдена).

деление ДНК из лейкоцитов проводили экспресс-методом с использованием реагента "ДНК-экспресс-кровь" (НПО "Литех"). Концентрацию ДНК измеряли с использованием реагентов dsDNA HS Assay Kit и флюориметра Qubit ("Invitrogen").

Для тестирования выделенных образцов методом РЕД-Биолом [1] были отобраны 83 образца геномной ДНК в том, числе 35 с известной гетерозиготной мутацией Лейдена. В качестве теста сравнения использовался коммерческий набор "SNP-экспресс-РВ" (НПО "Литех") (http://www.lytech.ru/articles_111.htm) и амплификатор "iCycler iQ5" ("BioRad"). Количество вносимой в пробу ДНК составляло от 5 до 15 нг геномной ДНК. При этом с образцом выделенной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Результаты анализа кривых накопления флюоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов позволяют дать качественную оценку отсутствия или наличия мутантного аллеля в гетеро- или гомозиготной форме. Результаты дополнительно верифицировались методом ПЦР-РВ с использованием конкурирующих TaqMan-зондов в лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН (рук. М.Л. Филипенко).

Тест РЕД-Биолом проводили в два этапа. На первом этапе проводили синтез фрагмента ДНК с помощью ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих полиморфный сайт (dbSNP: rs6025). Праймеры для амплификации геномной ДНК (Lei-Up 5'-CATCATGAGAGACATCGCCTC-3' и LeiDn 5'-CATGTTCTAGCCAGAAGAAATTC-3' синтезированы фирмой "Биосан" (Новосибирск). Количество вносимой в пробу геномной ДНК со-

ставляло от 0,5 до 12,5 нг. На втором этапе продукты ПЦР размером 140 пар оснований использовали как матрицу для РЕХТ-реакции со следующими праймерами ("Биосан"): LeiN, комплементарным нормальному аллелю, меченному на 5'-конце 6-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM) (5'-FAM-AGCAGATCCCTGGACAGGCG-3') и LeiM, комплементарным мутантному аллелю, меченному олигоаденилатом (dA)₂₇ (5'- (A)₂₇AGCAGATCCCTGGACAGGCA-3'). В случае полной комплементарности последовательностей матрицы и аллель-специфичного праймера происходит его удлинение ДНК-полимеразой SNP-detect ("Евроген", Москва). В противном случае синтез не происходит. Реакционная смесь содержит смесь нуклеозидтрифосфатов, в которой вместо dTTP использовали биотинилированное производное дезоксиури-

Затраты на реагенты (в руб.) и трудозатраты (ЛЕ) на определение единичного SNP в разных технологических вариантах (на 1 биопробу)

Технологии	Затраты	Выделение ДНК	Амплификация и детекция	Общие затраты	
ПЦР-РВ (НПО "Литех", Москва)	Стоимость реагентов, руб.	26,75	47,5	74,25	
	Трудозатраты, ЛЕ	Производственные, ЛЕ	0,14	0,5	1,49
	Время работы прибора, ЛЕ		0,5	0,33	
РЕД-Биолом (Институт биофизики СО РАН, Красноярск)	Стоимость реагентов, руб.	26,75	32,5	59,25	
	Трудозатраты, ЛЕ	Производственные, ЛЕ	0,14	0,38	1,86
	Время работы прибора, ЛЕ		0,5	0,84	

динтрифосфата (Bio-dUTP, "Биосан"), поэтому образующиеся продукты содержат биотин (см. рисунок, а). Для анализа продуктов РЕХТ-реакции (см. рисунок, б) их переносили в лунки планшета, поверхность которых была активирована стрептавидином. Удлиненные ДНК-полимеразой праймеры иммобилизовались на поверхности лунок благодаря содержанию биотина. Их наличие выявляли с помощью конъюгатов мутантного обелина H22E;W92F с поли-(dT)₃₀ и мутантного обелина Y138F с антителами к FAM, смесь которых вносили в лунки. Биоломинесцентную реакцию обоих репортеров инициировали добавлением раствора CaCl₂ и регистрировали на планшетном люминометре Mithras LB 940 ("Berthold", Германия) в следующем режиме (в течение первой секунды интегрировали сигнал фиолетового репортера (H22E;W92F) через фотофильтр ФС-6, а затем в течение 3 с интегрировали зеленый сигнал (Y138F) через фотофильтр ЖС16. Генотип определяли по соотношению биоломинесцентных сигналов $BL_{Y138F}/BL_{H22E;W92F}$ (дискриминационный фактор, Д).

Для оценки аналитической воспроизводимости метода проводили трехкратное тестирование одних и тех же образцов ДНК. Оценку трудозатрат на проведение каждой технологии проводили хронометражем рабочего времени оператора, непосредственно потраченного на выполнение анализа в соответствии с методическими рекомендациями [13]. Затраты на реагенты и расходные материалы производили по счет-фактурам поставщиков. Расчет проводили с учетом производственной нагрузки, равной тестированию 20 биопроб ДНК в рабочую смену.

Результаты и обсуждение. Метод PED-Биолом позволяет однозначно выявить образцы ДНК с наличием или отсутствием в генотипе мутантного аллеля. Генотип определяется значением дискриминационного фактора Д, который представляет собой отношение сигналов биоломинесцентных репортеров, связанных с наличием нормального либо мутантного аллелей ($BL_{Y138F}/BL_{H22E;W92F}$) (при наличии двух нормальных аллелей (нормальный G/G-генотип) отношение сигналов составило $17 \pm 3,46$, а в случае наличия обоих аллелей (G/A-генотип) – $1,5 \pm 0,36$. Таким образом, значения дискриминационных факторов для образцов с наличием мутации и без мутации различаются более чем на порядок (см. рисунок, с). Использование одновременно двух фотопротеиновых репортеров с разными биоломинесцентными свойствами позволяет проводить анализ SNP выявлением обоих аллелей в одной лунке и таким образом удвоить количество образцов, анализируемых на одном планшете.

При сравнении результатов тестирования выбранных образцов с использованием технологий ПЦР-РВ и PED-Биолом не выявлено ни одного случая расхождения. Показано, что 48 образцов имели нормальный генотип (G/G), а 35 – гетерозиготный генотип (G/A). Таким образом, сравнительная чувствительность и специфичность в нашей выборке составили 100%.

Аналитическую воспроизводимую метода PED-Биолом оценивали по результатам трехкратного повторения анализа двух разных образцов ДНК с известными генотипами G/G и G/A в разные дни. Все результаты, полученные при повторении методики, полностью совпали по качественному критерию как для пробы с нормальным генотипом G/G, так и для пробы с гетерозиготным генотипом G/A. Коэффициент вариации фактора Д составил 14,4% для нормального генотипа и 10,5% для гетерозиготного.

Сравнение трудо- и финансовых затрат на расходные материалы и реагенты приведены в таблице. Поскольку в ходе работы использовали одни и те же образцы ДНК, то затраты на этапе выделения ДНК были одинаковыми. Производственные затраты для метода PED-Биолом меньше в сравнении с методом ПЦР-РВ, однако время работы прибора больше в 2,5 раза, что отражается на общих затратах. Проведенные расчеты показывают, что метод PED-Биолом, несмотря на кажущуюся сложность (наличие 2 этапов), вполне сопоставим по аналогичным параметрам с коммерческим методом ПЦР-РВ.

Финансовые затраты на выполнение теста PED-Биолом значительно ниже. Следует учесть возможное снижение стоимости реагентов для метода PED-Биолом при увеличении объема их серийного производства.

Таким образом, полученные результаты показали, что предложенный для определения однонуклеотидного полиморфизма Лейдена в гене V фактора свертывания крови метод PED-Биолом не отличается от коммерческого метода ПЦР-РВ (НПО "Литех") по способности выявления мутантного аллеля и не уступает параметрам экономической эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Shimomura O., Frank L.A. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay. *Anal. Methods*. 2013; 5: 636–40.
2. Folsom A.R., Cushman M., Tsai M.Y., Aleksic N., Heckbert S.R., Boland L.L. et al. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood*. 2002; 99 (8): 2720–5.
3. Doix S., Mahrousseh M., Jolac M., Laurent Y., Lorenzini J.L., Binquet C. et al. Factor V Leiden and myocardial infarction (in case, review of the literature with a meta-analysis. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*. 2003; 52 (3): 143–9.
4. Калашиникова Е.А., Кокаровцева С.Н. Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции. *Медицинская генетика*. 2005; 4 (8): 386–90.
5. Lindhoff-Last E., Luxembourg B. Evidence-based indications for thrombophilia screening. *Vasa*. 2008; 37 (1): 19–30.
6. Mahjoub T., Mtiraoui N., Tamim H., Hizem S., Finan R.R., Nsiri B. et al. Association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A genotypes in women with a history of recurrent idiopathic miscarriages. *Am. J. Hematol.* 2005; 80 (1): 12–9.
7. "Medical eligibility criteria for contraceptive use" – 3rd ed., World Health Organization, 2004; ISBN 92 4 156266 8 (NLM classification: WP 630).
8. Oh H., Smith C.L. Evolving methods for single nucleotide polymorphism detection (Factor V Leiden mutation detection). *J. Clin. Lab. Anal.* 2011; 25 (4): 259–88.
9. Frank L.A. Ca²⁺-regulated photoproteins (effective immunoassay reporters. *Sensors*. 2010; 10: 11 287–300.
10. Frank L.A., Borisova V.V., Markova S.V., Malikova N.P., Stepanyuk G.A., Vysotski E.S. Violet and greenish photoprotein obelin mutants for reporter applications in dual-color assay. *Analytical and Bioanalytical Chem.* 2008; 391: 2891–6.
11. Kudryavtsev A.N., Krasitskaya V.V., Petunin A.I., Burakov A.Y., Frank L.A. Simultaneous bioluminescent immunoassay of serum total and IgG-bound prolactins. *Anal. Chem.* 2012; 84: 3119–24.
12. Момот А.П., Ройтман Е.В., Елькомов В.А., Свириц П.В., Ольховский И.А., Жарков П.А. и др. Протокол ведения всероссийского регистра "Генетические факторы риска тромбоза у жителей, проживающих на территории РФ, клиническое фенотипирование и тромбопрофилактика тромбоэмболических осложнений в онтогенезе. Тромбоз, гемостаз и реология. 2010; 3 (43): 30–78.
13. Приказ МЗ РФ № 380 от 25.12.97 "О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации", 152 с.

REFERENCES

1. Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Shimomura O., Frank L.A. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay. *Anal. Methods*. 2013; 5: 636–40.
2. Folsom A.R., Cushman M., Tsai M.Y., Aleksic N., Heckbert S.R., Boland L.L. et al. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood*. 2002; 99 (8): 2720–5.
3. Doix S., Mahrousseh M., Jolac M., Laurent Y., Lorenzini J.L., Binquet C. et al. Factor V Leiden and myocardial infarction (in case, review of the literature with a meta-analysis. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*. 2003; 52 (3): 143–9.
4. Kalashnikova E.A., Kokarovtseva S.N. Association between