МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
Национальный технический университет Украины
Факультет биотехнологии и биотехники;

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Отдел геномики человека

Использование методов ДНК-анализа для диагностики моногенных наследственных заболеваний

Островной Денис Владимирович

Фенилкетонурия

- Одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний является фенилкетонурия
- В Украине на 8300 новорожденных один ребенок рождается больной ФКУ

Фенилаланингидроксилаза катализирует реакцию преобразования

фенилаланин + O_2 + тетрагидробиоптерин

↓

тирозин + вода + окисленный биоптерин

Цель работы

Провести ДНК-анализ мутаций и полиморфизма гена ФАГ и оптимизировать технологию проведения полимеразной цепной реакции для амплификации in vitro последовательности ДНК седьмого экзона этого гена.

Для достижения цели были поставлены основные задачи исследования:

- ДНК-анализ мутаций R408W, R158Q, Y414C, IVS10nt546, IVS12nt1 гена ФАГ
- ДНК-анализ мутаций в последовательности 7-го экзона гена ФАГ
- Анализ алельного полиморфизма VNTR-локуса 3`-нетранслированой области гена ФАГ

Объект и предмет исследования

- Объект исследования - ДНК человека полученная из лейкоцитов периферической крови
- Предмет исследования – анализ мутаций в 5, 7, 12 экзоне и 10, 12 интроне гена ФАГ

Методы:

- Выделение и очистка ДНК;
- амплификация in vitro последовательностей гена ФАГ методом полимеразной цепной реакции;
- рестрикционный анализ ПЦР-продуктов;
- гель-электрофорез

Этапы ДНК-анализа:

1. Выделение геномной ДНК из образцов венозной крови методом фенольной экстракции;
2. Амплификация in vitro фрагмента ДНК с помощью полимеразной цепной реакции;
3. Гидролиз ПЦР-продуктов при помощи эндонуклеаз рестрикции;
4. Гель-электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле.

Схема рестрикционного анализа для детекции мутаций R408W эндонуклеазой рестрикции Eco1301

Сайт узнавания Eco1301 CC $\frac{AA}{TT}$ GG

Фрагмент “нормальной” последовательности

-A-T-A-C-C-T-C-G-G-C-C-C
-T-A-T-G-G-A-G-C-C-G-G-G

-A-T-A-C-C-T-C-G-G-C-C-C
-T-A-T-G-G-A-G-C-C-G-G-G
245 п. н.

Фрагмент последовательности с мутацией

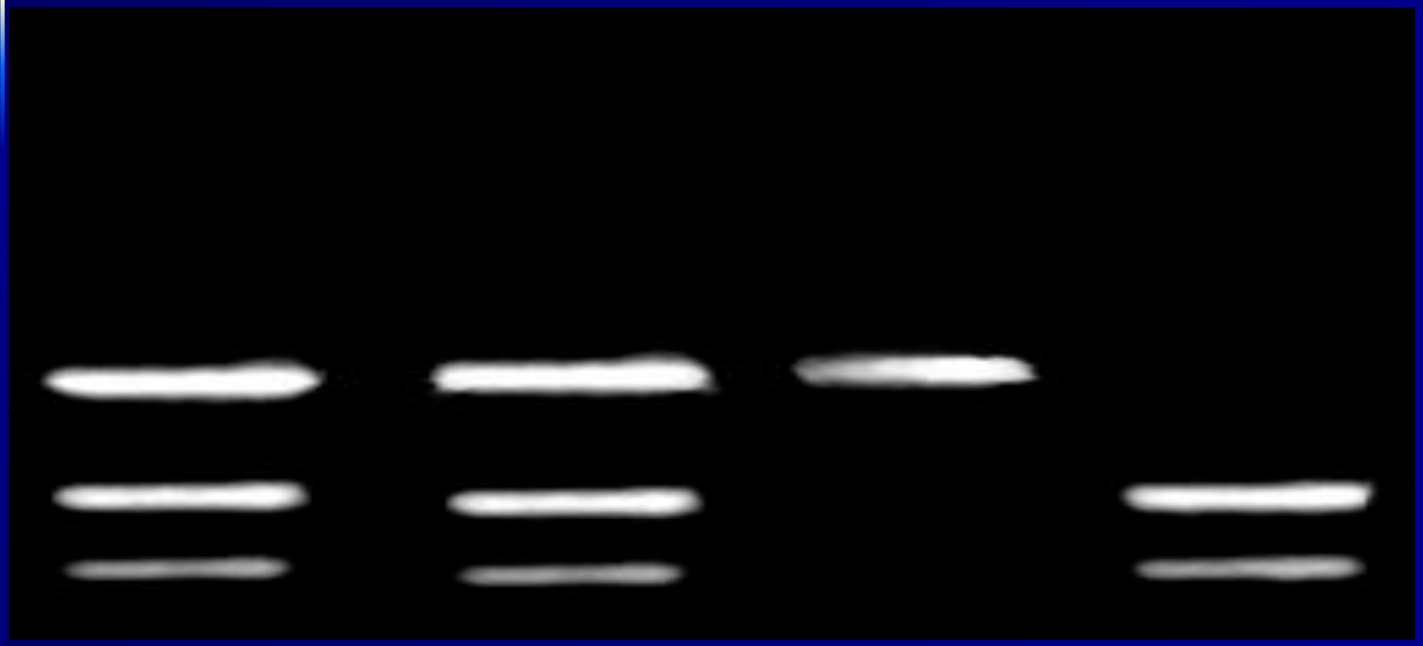
Сайт узнавания Eco1301

Eco1301

-A-T-A-C-C-T-T-G-G-C-C-C
-T-A-T-G-G-A-A-C-C-G-G-G

-A-T-A-C C-T-T-G-G-C-C-C
-T-A-T-G-G-A-A-C C-G-G-G
97 п. н. 148 п. н.

Анализ мутации R408W.



245 п.н.

148 п.н.

97 п.н.

1 2 3 4

1, 2 – R408W/норма, 3 – норма/норма,

4 – R408/R408W.

Схема рестрикционного анализа для детекции мутаций R158Q эндонуклеазой рестрикции MspI

Фрагмент “нормальной” последовательности

3`-T-T-C-T-G-C-C-T-T-C-5`

Фрагмент последовательности с мутацией R158Q

-T-T-C-T-G-T-C-T-T-C-

Отжиг праймера с неполной гомологией на 3`-конце

3`-T-T-C-T-G-C-C-T-T-C-5`

5`-A-A-G-C-3`

3`-T-T-C-T-G-T-C-T-T-C-5`

5`-A-A-G-C-3`

Амплификация фрагмента ДНК с созданием сайта рестрикции для MspI

Сайт узнавания MspI

MspI

-T-T-C-G-G-C-C- T-T-C-

-A-A-G-C -C-G-G-A-A-G-

-T-T-C-G-G-T-C-T-T-C-

-A-A-G-C-C-A-G-A-A-G-

Рестрикция MspI

-A-A-G-C-C-G G-A-A-G-

-T-T-C-G G-C-C-T-T-C-

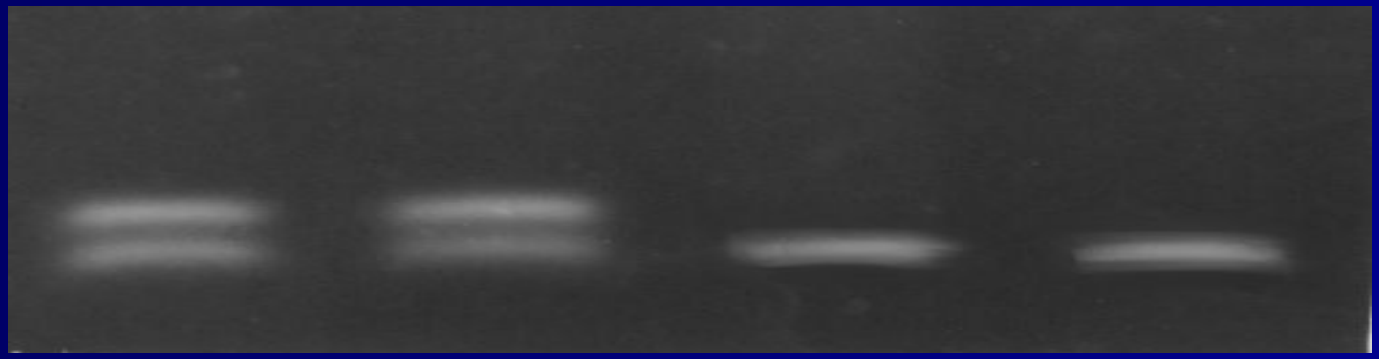
123 п. н. 19 п. н.

-A-A-G-C-C-A-G-A-A-G-

-T-T-C-G-G-T-C-T-T-C-

142 п. н.

Анализ мутации R158Q.



123 п.н.
119 п.н.

1 2 3 4

1, 2 - R158Q/норма;

3, 4 - норма/норма.

На первом этапе мы рассматривали четыре паралельно протикающие реакции:

1. ДНК+Pr →ДНК·Pr Образование комплекса ДНК·Pr
2. ДНК·Pr →ДНК+Pr Разрушение комплекса ДНК·Pr
3. ДНК+Pr →ДНК*·Pr Образование комплекса ДНК*·Pr с неполной гомологией
4. ДНК*·Pr →ДНК+Pr Разрушение комплекса ДНК*·Pr с неполной гомологией

Концентрации реагентов описываются системой диф. уравнений:

$$\begin{cases} \dfrac{dC(ДНК)}{dt} = -\dfrac{dC(ДНК\cdot \mathrm{Pr})}{dt} - \dfrac{dC(ДНК^{*}\cdot \mathrm{Pr})}{dt} \\ \dfrac{dC(ДНК\cdot \mathrm{Pr})}{dt} = \mathrm{V}_1 - \mathrm{V}_2 = k_1\cdot C(ДНК) - k_2\cdot C(ДНК\cdot \mathrm{Pr}) \\ \dfrac{dC(ДНК^{*}\cdot \mathrm{Pr})}{dt} = \mathrm{V}_3 - \mathrm{V}_4 = k_3\cdot C(ДНК) - k_4\cdot C(ДНК\cdot \mathrm{Pr}) \end{cases}$$

Решив данную систему мы получили:

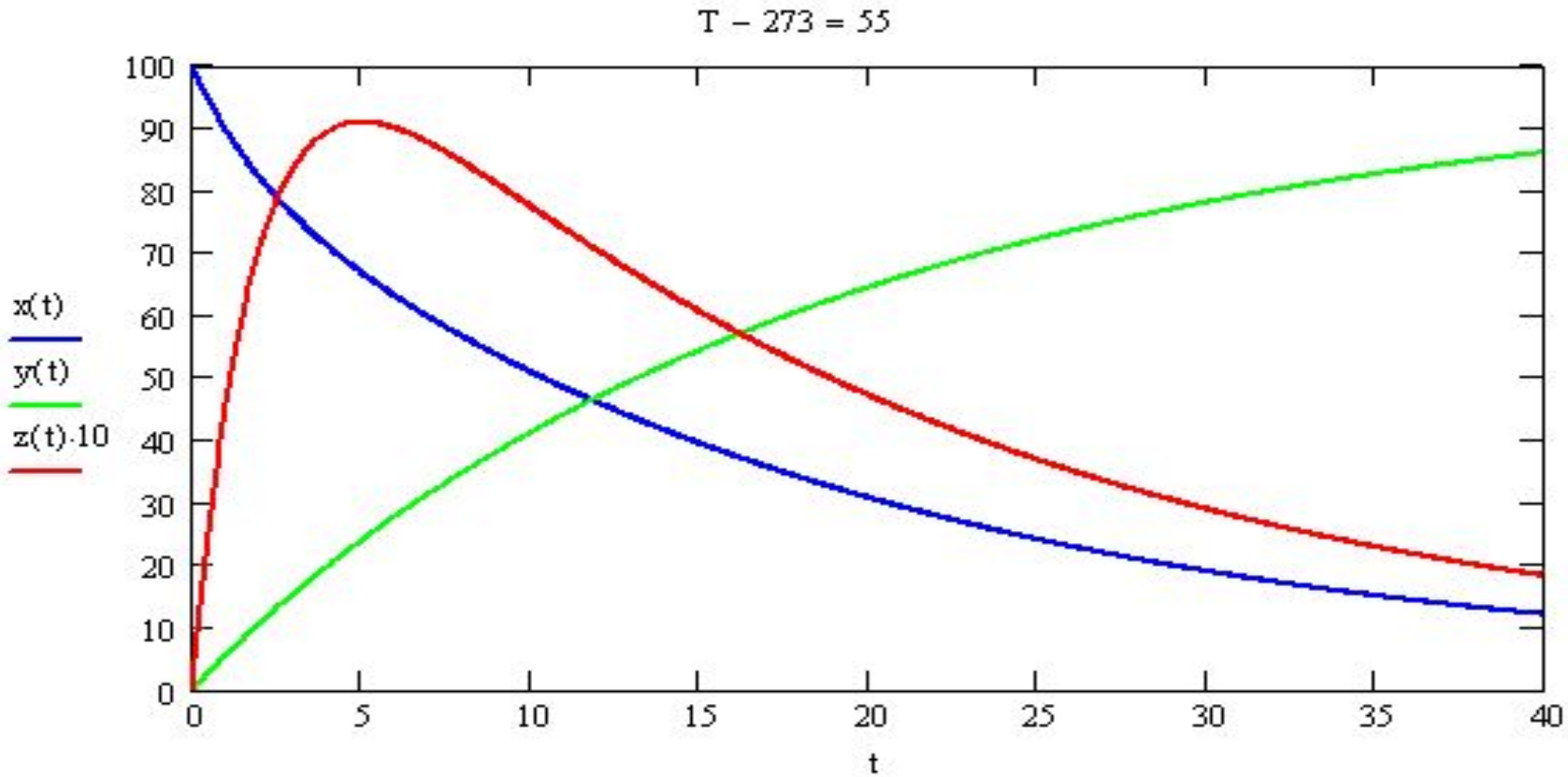
$$C(ssDNA) = \frac{k_4\cdot a\cdot b_2 + a\cdot k_1\cdot(k_1\cdot k_4 + k_2\cdot k_3 + k_2\cdot k_4)}{(b_1-b_2)\cdot(k_1\cdot k_4 + k_2\cdot k_3 + k_2\cdot k_4)}\cdot e^{\frac{-(k_1+k_2+k_3+k_4)+\sqrt{(k_1+k_2+k_3+k_4)^2-4\cdot(k_1\cdot k_4+k_2\cdot k_3+k_2\cdot k_4)}}{2}\cdot t}\cdot\left[\frac{-(k_1+k_2+k_3+k_4)+\sqrt{(k_1+k_2+k_3+k_4)^2-4\cdot(k_1\cdot k_4+k_2\cdot k_3+k_2\cdot k_4)}}{2}+k_2\right]-$$

$$-\frac{k_4\cdot a\cdot b_1 + a\cdot k_1\cdot(k_1\cdot k_4 + k_2\cdot k_3 + k_2\cdot k_4)}{(b_1-b_2)\cdot(k_1\cdot k_4 + k_2\cdot k_3 + k_2\cdot k_4)}\cdot e^{\frac{-(k_1+k_2+k_3+k_4)-\sqrt{(k_1+k_2+k_3+k_4)^2-4\cdot(k_1\cdot k_4+k_2\cdot k_3+k_2\cdot k_4)}}{2}\cdot t}\cdot\left[\frac{-(k_1+k_2+k_3+k_4)-\sqrt{(k_1+k_2+k_3+k_4)^2-4\cdot(k_1\cdot k_4+k_2\cdot k_3+k_2\cdot k_4)}}{2}+k_2\right]+\frac{k_2\cdot k_4\cdot a}{k_1\cdot k_4+k_2\cdot k_3+k_2\cdot k_4}$$

$$C(DNA.\mathrm{Pr}) = \frac{k_1\cdot k_4\cdot a\cdot b_2 + a\cdot k_1\cdot(k_1\cdot k_4 + k_2\cdot k_3 + k_2\cdot k_4)}{(b_1-b_2)\cdot(k_1\cdot k_4 + k_2\cdot k_3 + k_2\cdot k_4)}\cdot e^{\frac{-(k_1+k_2+k_3+k_4)+\sqrt{(k_1+k_2+k_3+k_4)^2-4\cdot(k_1\cdot k_4+k_2\cdot k_3+k_2\cdot k_4)}}{2}t}-$$

$$-\frac{k_1\cdot k_4\cdot a\cdot b_1 + a\cdot k_1\cdot(k_1\cdot k_4 + k_2\cdot k_3 + k_2\cdot k_4)}{(b_1-b_2)\cdot(k_1\cdot k_4 + k_2\cdot k_3 + k_2\cdot k_4)}e^{\frac{-(k_1+k_2+k_3+k_4)-\sqrt{(k_1+k_2+k_3+k_4)^2-4\cdot(k_1\cdot k_4+k_2\cdot k_3+k_2\cdot k_4)}}{2}t}+\frac{k_1\cdot k_4\cdot a}{k_1\cdot k_4+k_2\cdot k_3+k_2\cdot k_4}$$

График зависимости концентрации ssДНК и комплексов ДНК·Pr, ДНК·Pr* от времени



x(t) – C(ssDNA)
y(t) – C(ssDNA·Pr)
z(t) – 10*C(ssDNA*·Pr)

На втором этапе мы рассматривали шесть паралельно протикающие реакции:

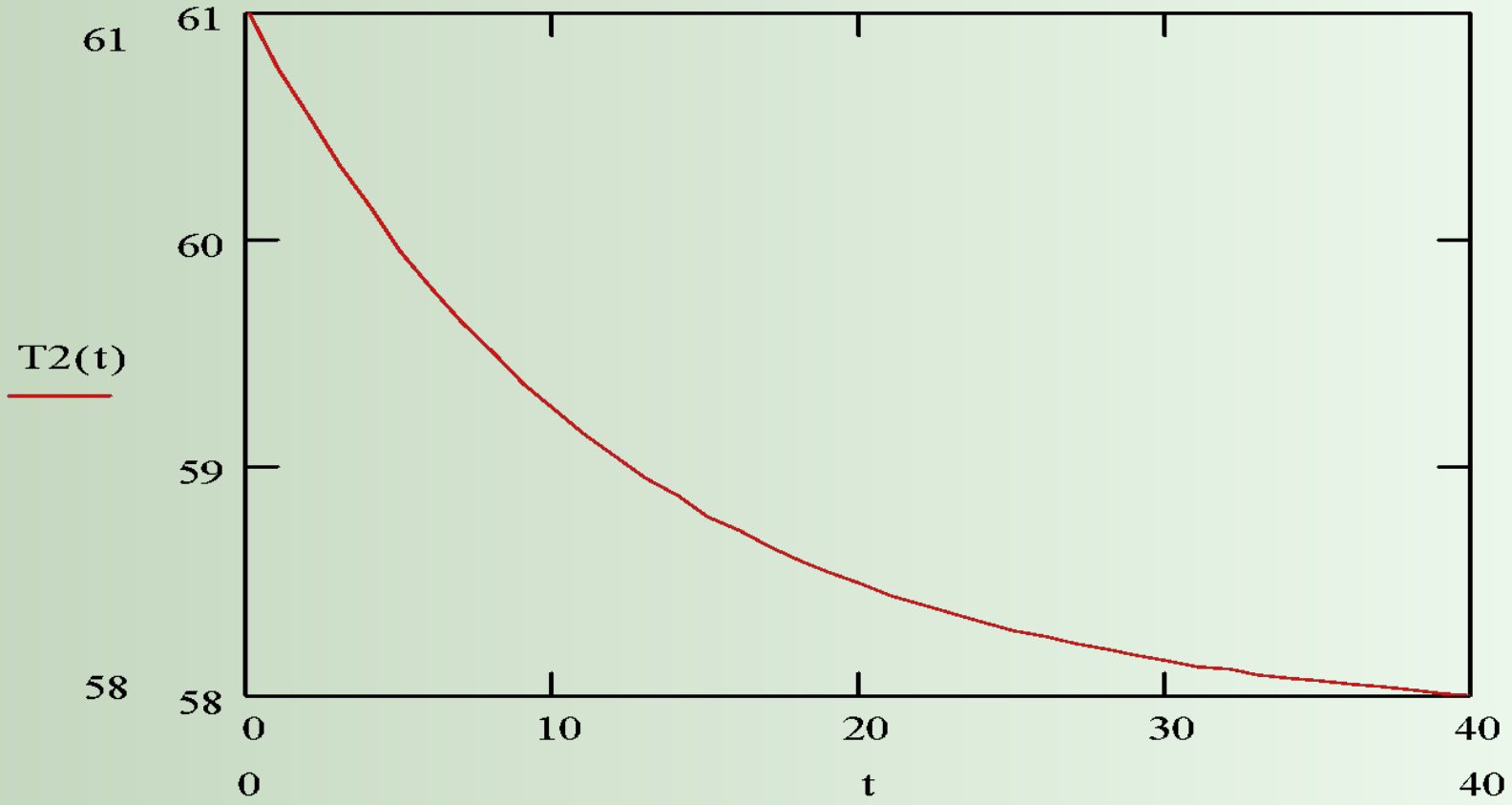
1. ДНК+Pr →ДНК·Pr Образование комплекса ДНК·Pr
2. ДНК·Pr →ДНК+Pr Разрушение комплекса ДНК·Pr
3. ДНК+Pr →ДНК*·Pr Образование комплекса ДНК*·Pr с неполной гомологией
4. ДНК*·Pr →ДНК+Pr Разрушение комплекса ДНК*·Pr с неполной гомологией
5. ssДНК·Pr + dNTP → ДНК + H_3PO_4 Образование двухцепочечной спирали ДНК
6. ssДНК*·Pr + dNTP → ДНК* + H_3PO_4 Образование двухцепочечной спирали ДНК

Данные процессы описываются системой диф. уравнений:

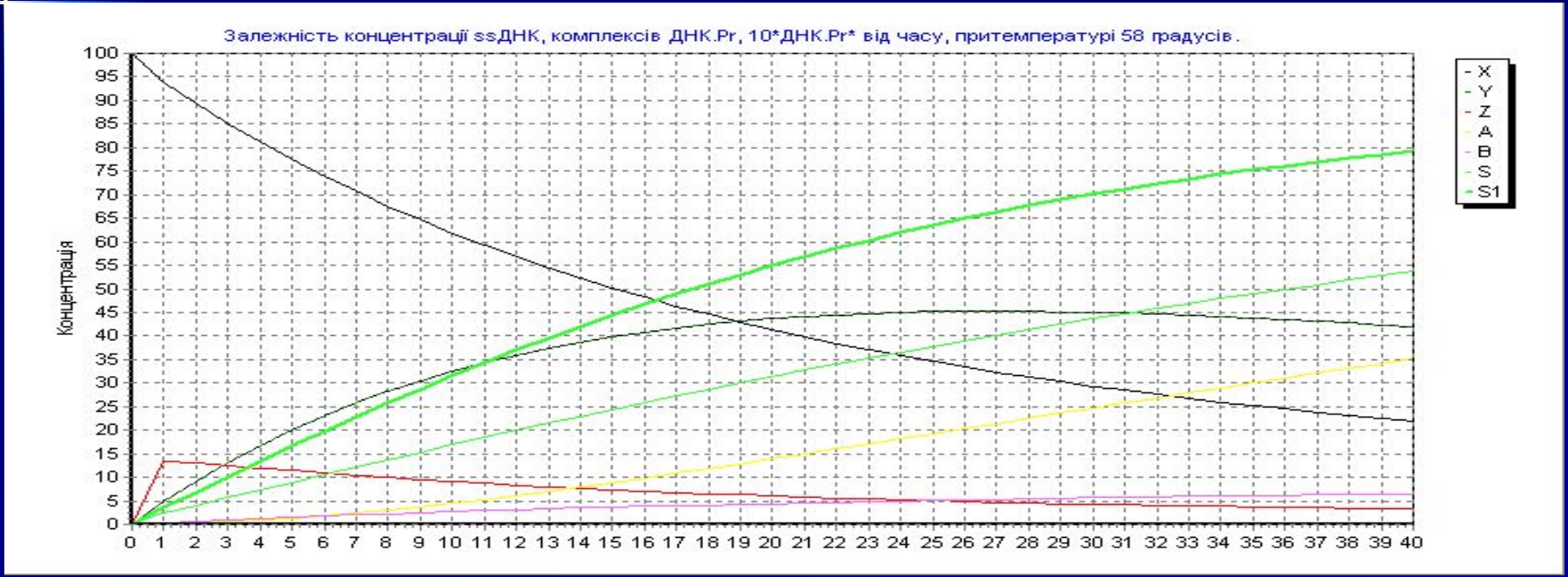
$$\begin{cases} \dfrac{dC(ssDNA)}{dt} + \dfrac{dC(ssDNA \cdot \mathrm{Pr})}{dt} + \dfrac{dC(ssDNA^{*} \cdot \mathrm{Pr})}{dt} + \dfrac{dC(DNA)}{dt} + \dfrac{dC(DNA^{*})}{dt} = 0 \\ \dfrac{dC(ssDNA \cdot \mathrm{Pr})}{dt} = k_1 \cdot C(ssDNA) - k_2 \cdot C(ssDNA \cdot \mathrm{Pr}) - k_5 \cdot C(ssDNA \cdot \mathrm{Pr}) \\ \dfrac{dC(ssDNA^{*} \cdot \mathrm{Pr})}{dt} = k_3 \cdot C(ssDNA) - k_4 \cdot C(ssDNA \cdot \mathrm{Pr}) - k_5 \cdot C(ssDNA \cdot \mathrm{Pr}) \\ \dfrac{dC(DNA)}{dt} = k_5 \cdot C(ssDNA \cdot \mathrm{Pr}) \\ \dfrac{dC(DNA^{*})}{dt} = k_6 \cdot C(ssDNA^{*} \cdot \mathrm{Pr}) \end{cases}$$

Оптимальный температурный режим отжига праймеров описывается формулой

$$T=57.88+3.11e^{-0.0825\tau}$$

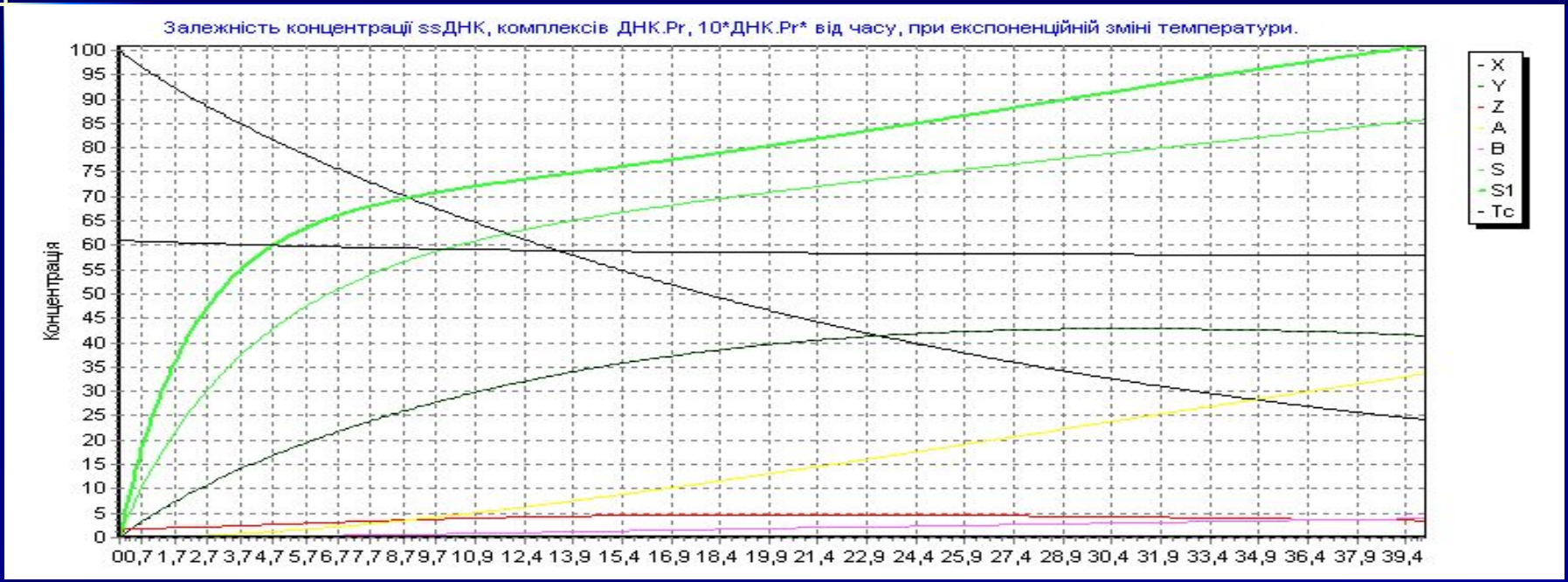


Зависимость концентрации ssDNA, DNA.Pr, DNA.Pr* и специфичности от времени, при температуре T=58C



Где: X – концентрация одноцепочечных молекул ДНК; Y - кон. комплексов ДНК·Пр; Z - кон. не специфических скомплексов ДНК·Пр; A - кон. специфического ПЦР продукта; B - кон. не специфического ПЦР продукта; S – отношение специфического ПЦР продукта к неспецифическому; S1 – отношение специфического ПЦР продукта к неспецифическому, рассчитаная при условии что специфические и не специфические комплексы превратятся в ПЦР продукт при элонгации.

Зависимость концентрации ssDNA, DNA.Pr, DNA.Pr* и специфичности от времени, при изменении температуры по формуле $T=57.88+3.11e^{-0.0825\tau}$



Где: X – концентрация одноцепочечных молекул ДНК; Y - кон. комплексов ДНК·Пр; Z - кон. не специфических скомплексов ДНК·Пр; A - кон. специфического ПЦР продукта; B - кон. не специфического ПЦР продукта; S – отношение специфического ПЦР продукта к неспецифическому; S1 – отношение специфического ПЦР продукта к неспецифическому, рассчитаная при условии что специфические и не специфические комплексы превратятся в ПЦР продукт при элонгации.

Схема рестрикционного анализа для детекции мутаций R252W (эндонуклеаза рестрикции AvaI).

Сайт узнавания AvaI C$^{C}_{T}$CG$^{G}_{A}$G

Фрагмент “нормальной” последовательности

Сайт узнавания AvaI

AvaI

-T-C-C-T-C-T-C-G-G-G-A-T-T-

-A-G-G-A-G-A-G-C-C-C-T-A-A-

-T-C-C-T-C T-C-G-G-G-A-T-T-

-A-G-G-A-G-A-G-C-C C-T-A-A-

56 п. н. 113 п. н.

Фрагмент последовательности с мутацией R252W

-T-C-C-T-C-T-T-G-G-G-A-T-T-

-A-G-G-A-G-A-G-C-C-C-T-A-A-

-T-C-C-T-C-T-T-G-G-G-A-T-T-

-A-G-G-A-G-A-G-C-C-C-T-A-A-

169 п. н.

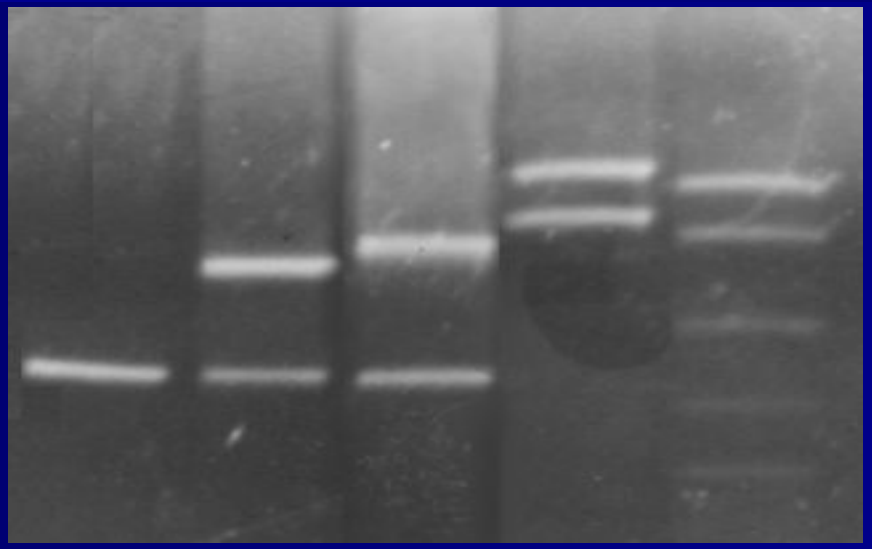
Анализ мутаций R252W

169 п.н.
147 п.н.
113 п.н.

1 2 M

1 - R252W/норма
2 - норма/норма
M - Маркер молекулярной массы

Электрофореграмма продуктов амплификации VNTR –полиморфизма



1 2 3 4 M

1 - генотип 3/3 (380/380 п.н.); 2 - генотип 3/7 (380/500 п.н.);
3 - генотип 3/8 (380/530 п.н.); 4 - генотип 9/12 (560/650 п.н.);
M - Маркер молекулярной массы ДНК плазмиды pBR322 гидролизированная эндонуклеазой MspI

Выводы

1. Проведен ДНК-анализ мутаций R408W, IVS12nt1, R158Q, Y414C, IVS10nt546 гена ФАГ в 68 образцах. Двадцать три из них в дальнейщем использовались в качестве ДНК-матрици для амплификации седьмого экзона гена ФАГ.
2. Подобраны условия для амплификации in vitro и рестрикции последовательности седьмого екзона гена ФАГ.
3. Рассчитана математическая модель отжига праймеров и предложен оптимальный температурный режим амплификации который представлен в виде функции $T=57.88+3.11e^{-0.0825T}$.
4. Проведен анализ аллельного полиморфизма VNTR-локуса гена ФАГ с использованием специфической амплификации in vitro последовательности 3'-нетранслированного участка этого гена.
5. Проведенные иследования позволили оптимизировать анализ идентифицируемых мутаций для проведения пренатальной ДНК-диагностики фенилкетонурии с целью предупреждения рождения больных детей.

Автор выражает благодарность:

Преподавателям факультета биотехнологии и биотехники.

Сотрудникам отдела геномики человека Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Лившиц Людмиле Аврамовне

Нечипоренко Марине Владимировне

Кравченко Сергею Афанасьевичу

Помпуха Владимиру Николаевичу

Грищенко Наталье Владимировне

Ясинской Ольге Анатольевне

Сима Любовь Викторовне