

Использование метода ПЦР в режиме "реального времени" для выявления мутации основателя в гене NBS1 при синдроме Ниймеген

Скопонец Е.Я.
РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии



Актуальность

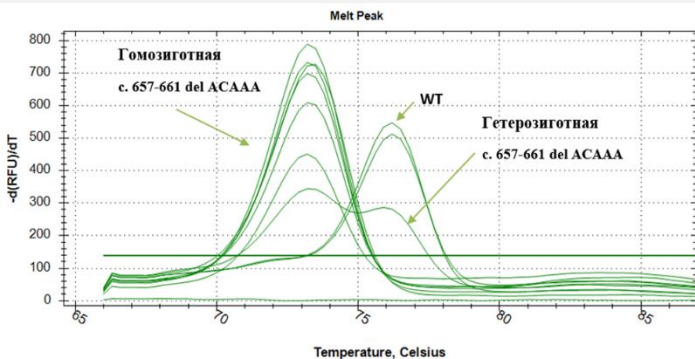
Синдром Ниймеген — редкое врожденное аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к группе врожденных дефектов иммунной системы (ПИД), характеризуется микроцефалией, иммунодефицитом и нарушением ДНК-репарации. Эти нарушения ведут к высокой чувствительности к ионизирующему излучению и увеличивают риск развития онкологических заболеваний. Важную роль в молекулярно-генетической диагностике синдрома Ниймеген играют методы определения количества копий эксцизионных колец ДНК (TREC/KREC) и секвенирование по Сенгеру 6 экзона гена NBS1 (с.657_661del5). Однако высокая стоимость секвенирования затрудняет массовое внедрение этого метода, создавая необходимость поиска альтернативных, более доступных диагностических подходов, например, посредством ПЦР в режиме «реального времени».

Цели и задачи

Разработать технологию ПЦР в режиме «реального времени» с использованием анализа кривых плавления для выявления гомо- и гетерозиготной мутации «основателя» с.657_661del5 в гене NBS1.

Результаты

Для проведения ПЦР в режиме «реального времени» были сконструированы 3 праймера: прямой праймер, специфичный к аллели дикого типа гена NBS1 – 5'- AGGACGGCAGGAAAGAAAACAA -3'; прямой праймер, специфичный к к аллели, несущий делецию с.657-661del5 – 5'- CAGGAAAGAAATCTTCAAAGGGAAA-3'; обратный праймер – 5'-AACATAATTACCTGTTTGGCATTCA-3'. Разработан оптимальный протокол проведения амплификации: 95°C - 5 минут; 35 циклов: 95°C - 10 с, 60°C – 25 с + plate read, 72°C – 25 с; 65–95 °C melt curve 7 с + 0,2 °C.



Гомо- и гетерозиготные образцы идентифицируются по различиям в форме кривой плавления. В ситуации, когда в целевой последовательности присутствует гомозиготная делеция, мутация детектируется как один результирующий пик плавления продукта ПЦР слева при температуре 73,2 °С, при ее отсутствии будет детектироваться один пик справа при 76,2 °С, при наличии гетерозиготной делеции – два пика: первый (мутантный) слева при температуре 73,2 °С, второй (дикий тип) справа при температуре 76,2 °С. Расчет диагностической чувствительности и специфичности на основании результатов использования разработанной методики выявил высокие показатели (100%), что позволяет его использовать в качестве метода молекулярно-генетической диагностики синдрома Ниймеген у пациентов и их родственников.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты с гомозиготной мутацией с.657_661del5 в гене NBS1 (N=10), гетерозиготные носители (N=10), здоровые лица (N=10). Разработка ПЦР-технологии для определения наличия альтернативного варианта с.657_661del5 проводилась с использованием реагентов для ПЦР «ArtMix Color ДНК-полимераза» (АртБиоТех, Беларусь) на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США). Наличие гомо- и гетерозиготной делеции гена NBS1 дополнительно подтверждалось капиллярным секвенированием по Сенгеру на генетическом анализаторе ABI 3130, Hitachi (Япония). Полученные в ходе секвенирования данные анализировались при помощи программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2 и BioEdit.

Выводы

Разработана технология ПЦР в режиме «реального времени» с анализом кривых плавления для выявления гомо- и гетерозиготных мутаций основателя в гене NBS1 для улучшения качества диагностики синдрома Ниймеген. Разработанная методика позволяет определить как гомозиготную делецию в гене NBS1 657del5, которая ассоциирована с синдромом Ниймеген, так и гетерозиготное носительство у родственников пациентов с целью определения предрасположенности к онкологическим заболеваниям.

Скопонец Екатерина Ярославовна
Skopovets@yandex.ru