

В.Д. Гаюк, А.В. Алексеев
ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЧИПОВ В ДИАГНОСТИКЕ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

ГБУЗ СО Свердловская областная клиническая больница №1
ООО Инжиниринговый Центр «ЦИРИТ»
Екатеринбург, Россия

V.D. Gayuk, A.A. Alekseev
EXPERIENCE IN THE USE OF BIOCHIPS IN THE DIAGNOSIS OF
CANCER MARKERS

Sverdlovsk Regional Clinical Hospital №1
Engineering Center "CIRIT"
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: gayuk66@yandex.ru

Аннотация. В статье обосновывается применение гидрогелевых ДНК-биочипов для выявления точечных мутаций в конкретных генах. В качестве контрольного метода исследования было проведено полногеномное секвенирование.

Annotation. The article explains the use of hydrogel DNA biochips for the detection of point mutations in specific genes. As a control method of the study was the whole-genome sequencing.

Ключевые слова: ДНК-биочип; точечная мутация; полногеномное секвенирование.

Keywords: DNA biochip; SNP; genome-wide sequencing.

Биочипы – один из новейших инструментов биологии и медицины XXI века, позволяют за короткое время определять тысячи различных генетических дефектов, онкогенов, белков и небелковых метаболитов, аллергенов, различных БАВ и многие другие молекулы [1]. Биочипы позволяют найти в организме человека любые интересующие врача маркеры, соответствующие конкретным заболеваниям, определенным вирусам, бактериям, раковым клеткам, определить широкий спектр лекарственных веществ, гормонов, наркотиков, ядов, пестицидов практически в любом анализируемом материале – кровь, слюна, пот, вода, пища, воздух или образцы почвы [2, 3].

Цель исследования – разработка технологии диагностики онкологических маркеров с применением биочипов.

Материалы и методы исследования

Был разработан гидрогелевый ДНК-биочипа «низкой плотности» с предварительно синтезированными и нанесёнными на подложку зондами. Особенностью гидрогелевых биочипов является трехмерная структура ячеек

геля, в которых иммобилизованы ДНК-зонды. Для исследования был выбран гидрогель «Formascrib». Производство и обработка биочипов выполнялись с применением оборудования со схожей технологией поверхностного монтажа печатных плат. Алгоритм мультиплексной диагностики генетически значимых мутаций с применением технологии биочипов включает в себя следующие этапы (рис. 1):

1. Выделение тотальной РНК из клинического материала (цельная кровь или костный мозг).
2. Синтез кДНК на матрице выделенной РНК с помощью реакции обратной транскрипции.
3. Клонирование выбранных участков генов методом ПЦР с нанесением флюоресцентной метки.
4. Анализ нуклеотидной последовательности участков генов с целью выявления мутаций с использованием биочипа.

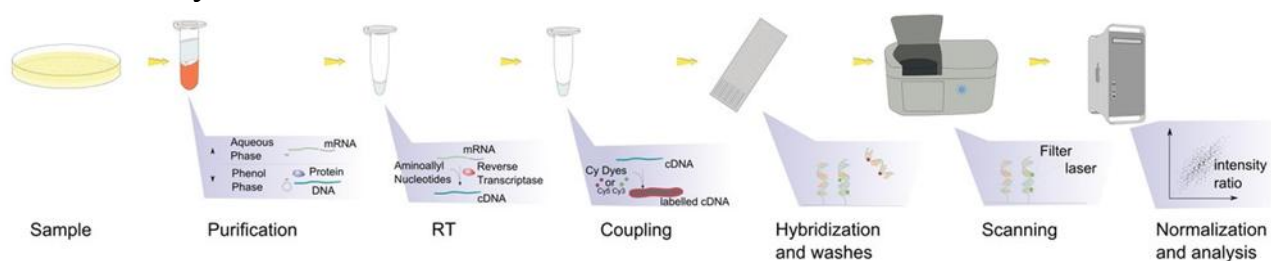


Рис. 1. Алгоритм диагностики мутаций с применением биочипов

Результат изображается в виде сетки с шаблоном и интенсивностей каждой функции (состоящие из нескольких пикселей), которые квантифицируются. Полученные данные анализируются.

Методика проведения контрольного метода (полногеномное секвенирование): тотальную РНК выделяли набором реагентов «QIAamp RNA Blood Mini Kit». После выделения РНК секвенировали на полногеномном секвенаторе HiSeq 2000 (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя. Получены ~42,4 млн. 100-нуклеотидных односторонних последовательностей с Q-оценкой ≥ 15 по системе оценки качества секвенирования PHRED.

Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму COBWeb (Strand, США) относительно референсного генома человека hg19 и базы последовательностей транскриптов RefSeq от 01.04.2013 г. После выравнивания идентифицирована геномная локализация для ~31,9 млн последовательностей (~73%), неидентифицированные последовательности исключены из анализа. Идентификацию известных SNP проводили по базе данных dbSNP137, функциональные последствия SNP оценивали по базе данных dbNSFP 2.0.

Результаты исследования и их обсуждение

В таблице 1 сведены результаты обнаруженных мутаций в целевых генах: ERG, NPM1, WT1, DNMT3A, CEBPA, FLT3, KIT, ETV6, RUNX3, PBX3, ABL1, BCR, TP73, NEDD9, MYC, CCND.

Таблица 1

Мутации, подтвержденные полногеномным секвенированием

Ген	Экзон	Мутация	Зиготность	DbSNP Id	Количество ридов	Измене ния в белке
ERG	12	del AATAT 4332-4336	Heterozygous	rs10546014	396	-
NPM1	6	ins A 1422	Homozygous	Novel	97	FS
WT1	8	C1689T	Heterozygous	rs200478998	55	-
	8	G1673T	Heterozygous	rs201040973	44	
	8	C1537T	Heterozygous	Novel	20	
DNMT3A	19	ins T 2340	Heterozygous	Novel	112	-
	23	ins T 3056	Heterozygous	Novel	112	
	23	ins T 3127	Heterozygous	Novel	112	
CEBPA	2	T334C	Homozygous	rs2098386	100	V102I
	1	G73A	Heterozygous	rs3213746	879	P15S
	16	A3158C	Heterozygous	Novel	92	I1043S
FLT3	6	G762A	Heterozygous	rs1933437	170	T227M
KIT	15	A2250C	Heterozygous	Novel	13	K721N
	15	ins A 2245	Heterozygous	Novel	13	FS
	15	ins A 2257	Heterozygous	Novel	13	FS
	15	ins A 2246	Heterozygous	Novel	13	FS
	15	ins A 2258	Heterozygous	Novel	13	FS
	15	ins A 2247	Heterozygous	Novel	13	FS
	15	ins A 2259	Heterozygous	Novel	13	FS
	15	ins A 2248	Heterozygous	Novel	13	FS
	15	ins A 2260	Heterozygous	Novel	13	FS
ETV6	8	A5876G	Heterozygous	rs201259889	36	-
RUNX3	5	G1309T	Heterozygous	rs202015637	21	T300P
	6	G1379T	Heterozygous		21	T314P
PBX3	4	T681C	Homozygous	rs1854706	25	-
	4	T767C	Homozygous		25	
ABL1	11	A3327G	Heterozygous	rs1056171	35	P1108P
	11	A3820G	Heterozygous		35	P1127P
BCR	10	A2983G	Homozygous	rs140504	53	N796S
	22	A4537G	Homozygous	rs28379041	35	-
	23	G4673T	Heterozygous	rs28573708	33	-
	23	A5746G	Homozygous	rs3876065	15	-
TP73	Intronic	A/G	Heterozygous	rs4098708	22	-
NEDD9	8	G2534A	Homozygous	rs1050775	51	T789T
	4	A1196G	Homozygous	rs941982	51	V343V
MYC	82	A14087C	Heterozygous	rs77140803	82	V4607G
CCND	4	G724A	Homozygous	rs1051130	720	S187A
	5	C949A	Homozygous			S178A

Выводы

Гидрогелевые ДНК-биочипы оправданы при обнаружении точечных мутаций генов, что было подтверждено проведением полногеномного секвенирования.

Литература

1. А.С. Разумов / Медицина XXI века: биочипы // Медицина в Кузбассе. 2009. №2, с. 3-5
2. Jaskowiak Pablo A., Campello Ricardo J.G.B., Costa Ivan G. / Proximity Measures for Clustering Gene Expression Microarray Data: A Validation Methodology and a Comparative Analysis // IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics. V. 10 (4). P. 845-857
3. Hoek KS, Schlegel NC, Eichhoff OM et al. / Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy // Pigment Cell Melanoma Res. 2009. V. 21 (6). P. 665-676

УДК 616-006.446.8

Д.В. Изотов, А.В. Виноградов
МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКА В
ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ХИМИОТЕРАПИИ
ПРИ ОМЛ

ГБУЗ СО Свердловская областная клиническая больница №1
Екатеринбург, Россия

D.V. Izotov, A.V. Vinogradov
MATHEMATICAL MODELING OF PROTEIN STRUCTURE IN THE
STUDY OF MECHANISMS OF RESISTANCE TO CHEMOTHERAPY IN
AML

Sverdlovsk Regional Clinical Hospital №1
Ekaterinburg, Russia

E-mail: phoenus@yandex.ru

Аннотация. В статье рассмотрен метод математического моделирования третичной структуры белка в аспекте его применения для изучения механизмов аутоактивации белка Flt3 и формирования резистентности к таргетным химиопрепаратам.

Annotation. The article describes the method of mathematical modeling of tertiary protein structure in the aspect of it's use for the study of Flt3 autoactivation mechanisms and the development of resistance to targeted chemotherapy drugs.

Ключевые слова: FLT3; ОМЛ; селективные ингибиторы тирозинкиназы; резистентность.

Keywords: FLT3; AML; tyrosine kinase inhibitor; resistance.