

Выявление мутаций в «горячих» участках генома: ампликоны-«шпильки» в методе плавления ДНК

В.Н. Кондратова, И.В. Ботезату, В.П. Шелепов, А.В. Лихтенштейн

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Амплификация с последующим плавлением ДНК с зондами TaqMan эффективно выявляет мутации в «горячих» участках генома. Однако необходимость проводить полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в асимметричном варианте обуславливает ряд ограничений этого метода: 1) невозможность количественного анализа из-за снижения эффективности амплификации; 2) необходимость выполнения 2 независимых ПЦР для выявления мутаций в комплементарных нитях ампликона; 3) усложнение дизайна ПЦР. Преодоление этих ограничений оказалось возможным при использовании в симметричной ПЦР комбинированных праймеров, состоящих из универсальной и специфической последовательностей: образующиеся в результате одностранные «шпильчатые» (hairpin) ампликоны (sense и antisense) не способны ренатурировать друг с другом, но независимо гибридизуются с присутствующими в среде зондами TaqMan (antisense и sense соответственно). Разработанный способ позволяет в одном тесте получить количественные (число копий) и качественные (наличие мутаций в обеих нитях ампликона) характеристики исследуемого участка ДНК.

Ключевые слова: сканирование мутаций, плавление ДНК, зонды TaqMan, KRAS, «шпильчатые» ампликоны

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-46-52

Detection of gene mutations in genome “hot” spots: “hairpin” amplicons in DNA melting analysis

V.N. Kondratova, I.V. Botezatu, V.P. Sheleпов, A.V. Lichtenstein

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Polymerase chain reaction (PCR) followed by DNA melting analysis with TaqMan probes effectively reveals mutations in the human genome “hot” spots. The necessity to carry out PCR in the asymmetric variant causes, however, a number of restrictions of this method: 1) an inability of quantitative estimates of gene copy numbers; 2) the need for 2 independent PCR tests for detection of mutations in both complementary strands of an amplicon (this approach improves reliability and sensitivity of the analysis); 3) the complication of PCR design and decrease in efficiency of amplification. Overcoming these restrictions was possible by means of symmetric PCR with primers containing the specific and universal sequences: the single-stranded “hairpins” (sense and antisense) are not capable to anneal with each other, but they can hybridize independently with 2 TaqMan probes present in the reaction mixture. The proposed approach allows quantitative and qualitative characterization of a DNA sample (the copy number estimates as well as mutation scanning of both complementary amplicon strands).

Key words: mutation scanning, DNA melting analysis, TaqMan probes, KRAS, “hairpin” amplicons

Введение

Таргетная терапия онкологических заболеваний основана на предварительных исследованиях ключевых для определенной формы рака молекулярных показателей, в качестве которых наиболее часто выступают дефекты протоонкогенов и генов-супрессоров. Один из наиболее значимых объектов генодиагностики – онкоген *KRAS*, мутации которого в кодонах 12, 13 и 61 встречаются в ~ 40 % случаев рака толстой кишки [1] и прогнозируют негативный ответ на терапию анти-EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста). Однако выявление генных мутаций зачастую осложняется рядом обстоятельств: 1) ограниченным количеством образца ДНК; 2) длительностью и стоимостью анализа, затратами труда и реактивов; 3) низким содержанием мутантных

аллелей в исследуемом образце ДНК [2]. Критически важной в этой ситуации является возможность надежного, быстрого и экономичного сканирования генных мутаций.

В наибольшей степени удовлетворяет этим требованиям метод плавления ДНК (DNA melting analysis, DMA) с использованием гидролизуемых зондов TaqMan. Он прост в исполнении, производителен, экономичен и, кроме того, реализуется в «закрытом формате», исключая перекрестное загрязнение образцов [3–5]. В наших предыдущих исследованиях было показано, что зонды TaqMan могут быть использованы не только для мониторинга полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) и сканирования мутаций посредством DMA, но и в качестве блокирующих амплификацию

агентов. Это позволило проводить «обогащенную» ПЦР мутантных аллелей и примерно в 10 раз повысить чувствительность их обнаружения [6].

При этом асимметричный вариант ПЦР, который является необходимым условием данного подхода, так как обеспечивает избыточный синтез одной из 2 нитей ампликона, имеет ряд ограничений: 1) низкая эффективность амплификации и невозможность количественной оценки числа копий исследуемого гена; 2) необходимость проведения 2 независимых тестов для двунитевого сканирования мутаций, что увеличивает стоимость метода, затраты времени, труда и расходных материалов; 3) усложнение дизайна ПЦР.

Отмеченные ограничения этого весьма перспективного метода возможно устранить, используя комбинированные праймеры, которые состоят из универсальной и специфической последовательностей и способствуют образованию одностранных ампликонов-«шпикле» (sense и antisense). Последние стерически не способны ренатурировать друг с другом, но с высокой эффективностью гибридизуются с зондами TaqMan (antisense и sense соответственно). Это позволяет достичь поставленной цели: посредством симметричной ПЦР-РВ с последующим DMA определять как количественные (число копий), так и качественные (присутствие мутаций в обеих нитях ампликона) показатели исследуемого гена.

Материалы и методы

Образцы ДНК. Образцы опухолевой ткани (рака легкого и толстой кишки, меланомы) были получены в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Образцы опухолевой ткани замораживали в жидком азоте или фиксировали формальдегидом и заключали в парафиновые блоки. ДНК выделяли из клеток и опухолевой ткани депротеинизацией фенолом и хлороформом, а из ткани в парафиновых блоках – с помощью набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию ДНК

определяли спектрофотометрически (Nano-Drop 1000, Thermo Scientific).

Секвенирование обеих нитей ампликона *KRAS* осуществляли методом Сэнгера с использованием панели BrightDye Terminator reagents (Nimagen, Нидерланды) и последующим анализом продуктов реакции на автоматическом анализаторе ABI Prism 3130xl Genetic Analyser (Syntol, Россия).

Термодинамические расчеты температуры плавления ДНК (T_m) выполняли с помощью программы MeltCalc [7].

Разделение ДНК методом SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) [8, 9] проводили посредством электрофореза в 12 % полиакриламидном геле (отношение акриламид/бисакриламид 1:50), приготовленном на 0,5-кратном трис-ацетатном буфере; pH 8,0; 2,5 ч при 400 В (20 В/см) и температуре +4 °С. Полосы окрашивали SYBR Gold (разведение 1:10 000).

ПЦР-РВ и DMA. Размеры ампликонов *KRAS*, а также праймеры и зонды TaqMan к ним представлены в таблице. Праймеры к последовательности *KRAS* (Genbank Accession number NG_007524.1) определили с помощью программы Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corp., США). Схема ампликонов *KRAS* с взаимным расположением праймеров (стандартных и комбинированных), зондов TaqMan и «горячего» участка (кодона 12 и 13) представлена на рис. 1. Зонды «сдвинуты» друг относительно друга (перекрывание – 8 оснований) во избежание их «полной» гибридизации во время ПЦР-РВ и DMA. Ампликоны размером 114 и 174 пары оснований синтезируются при использовании стандартных и комбинированных праймеров соответственно (последние содержат на 5'-конце универсальную GC-обогащенную последовательность UPS (Universal Primer Sequence)) [10].

Симметричную ПЦР-РВ проводили в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 67 мМ трис-НСl, pH 8,8; 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

Полимеразная цепная реакция и метод плавления ДНК

Праймер*, зонд TaqMan**	Ампликон*** (длина, пары оснований)	Последовательности праймеров и зондов (число оснований)
Стандартный праймер: прямой обратный	K2(114)	5'-gcctgctgaaaatgactg (18) 5'-ttggatcatattgctccaca (21)
Комбинированный праймер: прямой обратный	K2(174)	5'-gccccgctactagcctaccgctagcagcggcctgctgaaaatgactg (48) 5'-gccccgctactagcctaccgctagcagcgggtggatcatattgctccaca (51)
Зонды TaqMan: K2-ROX(25)s K2-Cy5(25)as		5'-ROX-actgtggtagttggagctggtggc-BHQ2 5'-Cy5-aaggcactctgctaccgcccag-BHQ2

*Специфические (геномные) последовательности стандартных и комбинированных праймеров одинаковы и обозначены строчными буквами; универсальная последовательность комбинированных праймеров подчеркнута.

**В названии зонда TaqMan указаны ампликон, флуорофор, длина олигонуклеотида и направление (sense или antisense).

***Название ампликона произведено от названия гена, номера экзона и размера (пары оснований).

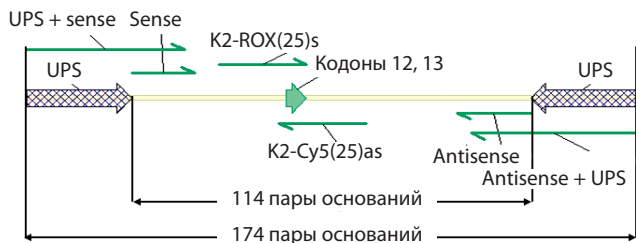


Рис. 1. Схема ампликонов K2(114) и K2(174) (название ампликона произведено от гена KRAS, номера экзона и размера ампликона). Стрелками показано расположение праймеров (стандартных и комбинированных, т. е. с последовательностью UPS), зондов TaqMan и «горячего» участка KRAS (кодонами 12 и 13)

0,01 % Tween 20; 2,5 мМ MgCl₂; по 0,2 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов; по 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров; по 0,1 мкМ зондов TaqMan K2-ROX(25)s и K2-Cy5(25)as (см. таблицу); 1,5 ед. Hot-rescue Taq-полимеразы; 5 мкл раствора ДНК (30–100 нг) в воде. Условия ПЦР: начальная денатурация в течение 5 мин при температуре 95 °С, после чего 50 циклов плавления (15 с при температуре 95 °С), отжига (30 с при температуре 56 °С) и элонгации (30 с при температуре 72 °С) с регистрацией флуоресценции.

Условия DMA: денатурация в течение 3 мин при температуре 95 °С, быстрое охлаждение до 55 °С и инкубация 3 мин при 55 °С, после чего плавление до 85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 10 с). Данные анализировали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6).

Результаты и обсуждение

Возможность тестировать мутации методом DMA с зондами TaqMan реализуется за счет отказа от количественного анализа ДНК, поскольку требует асимметричного (значительно менее эффективного) варианта амплификации. Так обеспечивается присутствие в инкубационной среде наряду с двунитевыми ампликонами некоторого числа избыточных одонитевых ампликонов (не находящихся себе комплементарной пары). В DMA они служат «мишенями» зондов TaqMan.

Поскольку в процессе асимметричной ПЦР можно создать избыток только одной (sense или antisense) нити, то для мутационного сканирования обеих нитей необходимо проведение 2 независимых тестов. Аналогично общепринятой практике двунитевого секвенирования ДНК исследование зондами TaqMan обеих нитей ампликона представляется целесообразным, поскольку оно, по нашим данным, повышает надежность и чувствительность анализа [4].

Отмеченные недостатки, равно как относительно низкая эффективность асимметричной ПЦР, стимулируют поиск «симметричного» варианта амплификации для последующего мутационного сканирования. Препятствием здесь оказывается быстрая и неизбежная ренатурация комплементарных ампликонов, присутствующих в среде в эквимольных концентрациях

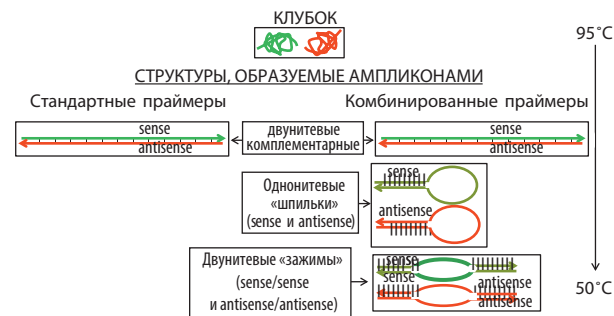


Рис. 2. Схема структур, возникающих при ренатурации стандартных и «шпилечных» ампликонов

(для гибридизации зондов при этом не остается «свободных» матриц).

Практически реализуемым решением задачи сохранения части комплементарных ампликонов в одонитевой форме (и их способности взаимодействовать с зондами TaqMan, но не друг с другом) является придание им псевдокольцевой («шпилечной») конформации. Она может возникнуть, когда на обеих сторонах олигонуклеотида имеются «липкие концы», для чего достаточно присутствия на 5'-стороне каждого праймера одной и той же (универсальной) последовательности [10]. На рис. 2 представлены вероятные структуры, возникающие при ренатурации обычных ампликонов и UPS-ампликонов (ампликонов, содержащих на 5'-конце последовательность UPS). Если в первом случае формируются исключительно линейные двунитевые «стержни», то во втором наряду со «стержнями» могут возникать одонитевые «шпильки» (sense и antisense), а также двунитевые «зажимы» (clamps), состоящие из 2 идентичных (sense/sense и antisense/antisense) антипараллельно идущих нитей. В отличие от линейных ампликонов «шпильки» и «зажимы» сохраняют геномные последовательности в одонитевой форме и, следовательно, должны быть доступны зондам TaqMan.

Прежде всего мы оценили возможность использования комбинированных праймеров в симметричной ПЦР-РВ. Серийные разведения ДНК, выделенной из нормальных клеток крови человека, использовали для синтеза ампликонов K2(114) и UPS-ампликонов K2(174); мониторинг реакции вели посредством зондов TaqMan K2-Cy5(25)as и K2-ROX(25)s соответственно. Эффективность амплификации в обоих случаях оказалась одинаково высокой — около 100 % (рис. 3).

Возможность формирования UPS-ампликонами различных конформаций показана в опытах сдвига полосы (band shift), в которых продукты ПЦР-РВ анализировали методом SSCP [8, 9]. Особенность такого электрофореза — быстрая миграция линейных двунитевых «стержней», опережающая таковую соразмерных одонитевых «клубков». В соответствии с этой особенностью структуры, содержащие одонитевые «шпильки», движутся медленнее линейного

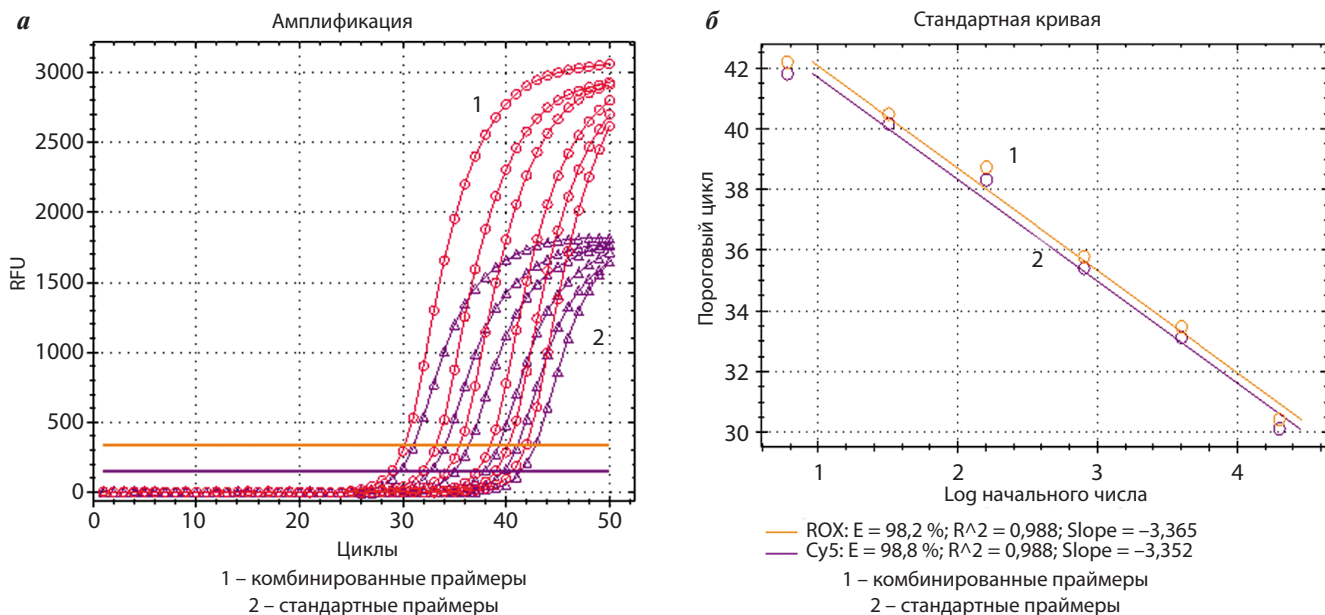


Рис. 3. Сопоставление эффективности симметричной полимеразной цепной реакции со стандартными или комбинированными праймерами: а – амплификация; б – стандартные серийные разведения (E – эффективность амплификации; R² – коэффициент корреляции; Slope – наклон линии, позволяющий определить эффективность амплификации)

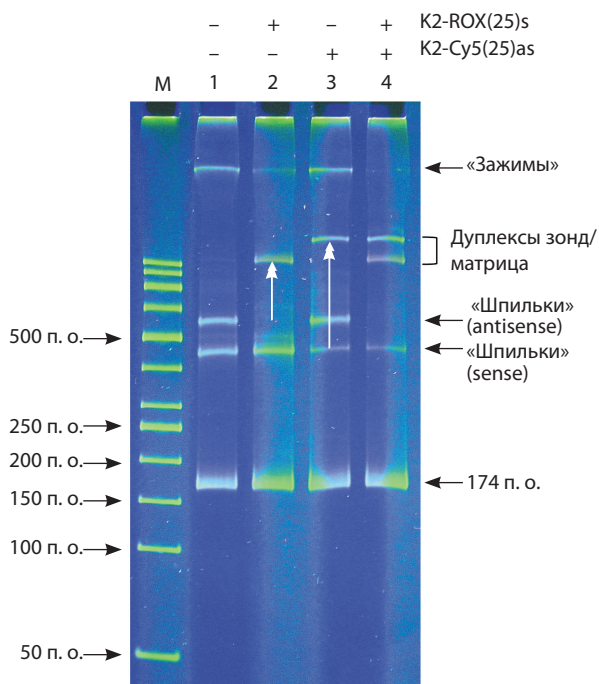


Рис. 4. Анализ продуктов симметричной полимеразной цепной реакции с комбинированными праймерами методом SSCP (M – маркеры молекулярной массы). Стрелками на фоне рисунка показаны сдвиги полос (band shifts), обусловленные взаимодействиями ампликонов с зондами TaqMan (обозначены над рисунком). Электрофоретические полосы, соответствующие различным комплексам, указаны стрелками (п. о. – пары оснований)

ампликона K2(174) (рис. 4). Отчетливые сдвиги полос (стрелки на фоне рис. 4), вызванные добавлением зондов K2-ROX(25)s и K2-Cy5(25)as, позволяют, во-первых, идентифицировать каждую из полос и,

во-вторых, сравнить связывающую способность зондов (если судить по полноте сдвига, наиболее эффективен в этом отношении K2-ROX(25)s). Не во всех экспериментах, но довольно часто видна медленно движущаяся, расположенная над «шпильками» полоса. Поскольку ее интенсивность при добавлении зондов заметно ослабевает (свидетельство взаимодействия и изменения подвижности), можно предположить, что она образована дунитевыми «зажимами» – единственными, помимо «шпилек», структурами, теоретически способными взаимодействовать с зондами.

На следующем этапе установлено, что количественные соотношения между разными конформациями варьируют в зависимости от условий ренатурации ампликонов. Очевидно, что термодинамически наиболее выгодны линейные «стержни», состоящие из 2 полностью комплементарных нитей (они являются итогом бимолекулярной реакции 2-го порядка). Менее термодинамически выгодные, частично комплементарные «шпильки» обладают, однако тем преимуществом, что возникают в результате внутримолекулярной реакции, т. е. формируются быстрее. Что касается частично комплементарных «зажимов», то они преимущественно «шпилек» не обладают, так как возникают в ходе бимолекулярной реакции (это, возможно, объясняет непостоянство их возникновения).

Поскольку оптимальные температуры ренатурации «стержней» и «шпилек» в реакционных условиях составляют примерно 85 и 75 °C соответственно [7], для увеличения доли «шпилечной» конформации отжиг ампликонов от 95 до 55 °C следует проводить так быстро, как только позволяет прибор

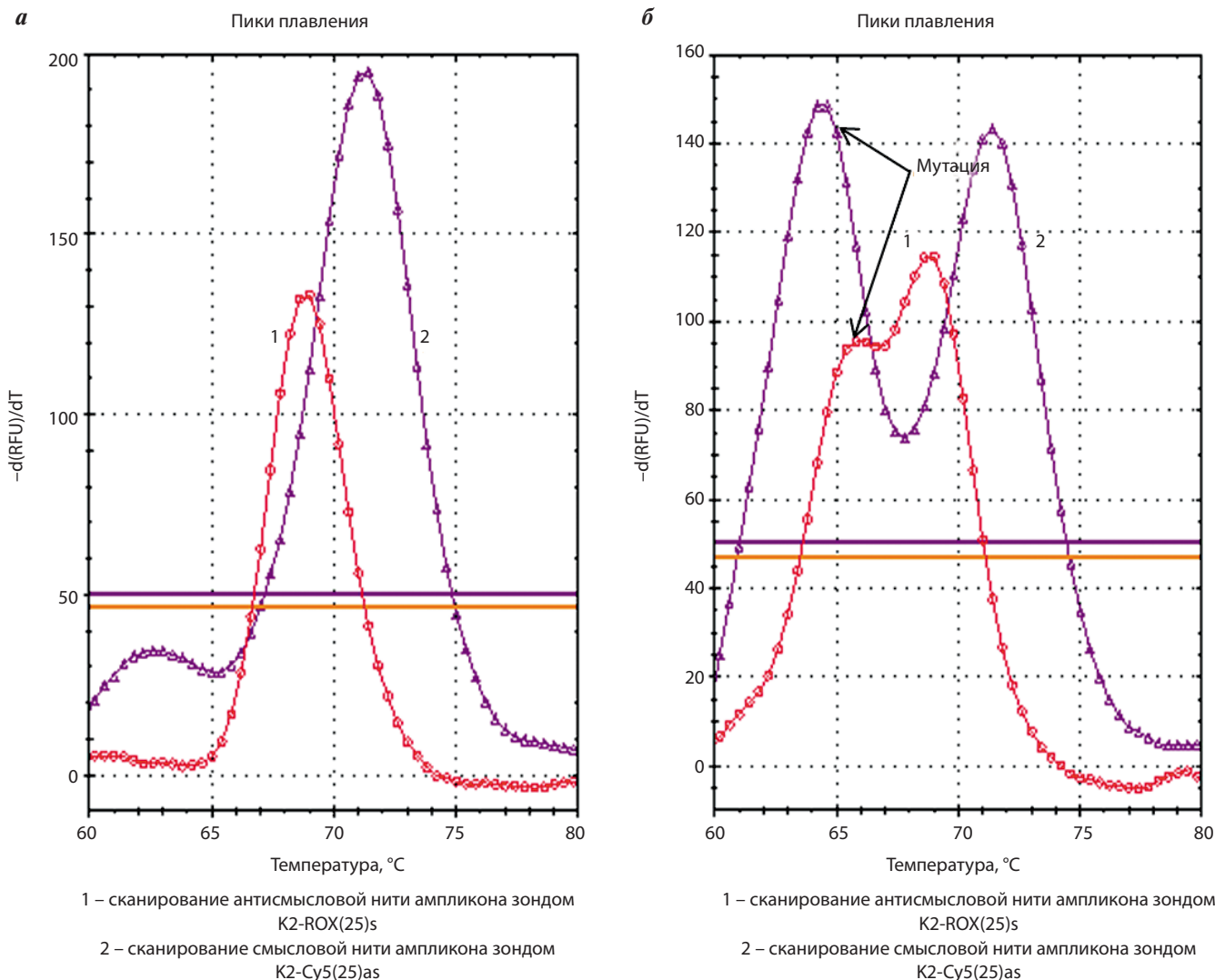


Рис. 5. Двунитевое сканирование онкогена *KRAS*: а – ДНК дикого типа (оба пика симметричны); б – ДНК рака толстой кишки с мутацией *GGC13GAC* (обе кривые обнаруживают присутствие гетеродуплексов, но в разной степени выраженное и с разной степенью дискриминации нормальных и мутантных аллелей). Стрелками указаны идентифицирующие мутацию гетеродуплексы

(так уменьшается время пребывания расплавленных ампликонов в интервале температур, оптимальном для формирования «стержней»). В проверочных экспериментах (здесь не представлено) подтверждено значительное усиление флуоресцентного сигнала зондов TaqMan при ускорении этапа ренатурации ампликонов.

Использование ампликонов-«шпилек» позволяет устранить ограничения стандартного DMA с зондами TaqMan, обусловленные необходимостью асимметричного варианта ПЦР. На рис. 5 представлены пики плавления ампликона гена *KRAS* из нормальной и опухолевой ткани (рак толстой кишки, мутация *GGC13GAC*). Оказалось возможным одновременно протестировать обе нити ампликона и в случае опухолевой ДНК идентифицировать мутацию в каждой из них (см. рис. 5б). Возможность исследовать обе нити ампликона важна, поскольку заранее неизвестно, какая из них более пригодна для выявления данного

типа мутации, т.е. эффективнее дискриминирует нормальный и мутантный аллели. Очевидно поэтому, что 2 теста дополняют друг друга.

На рис. 6 представлены результаты мутационного сканирования образцов ДНК, выделенных из парафиновых блоков ткани рака толстой кишки (мутации *GGT12GTT* и *GGT12GCT* гена *KRAS* соответственно), свидетельствующие о высокой эффективности двунитевого сканирования в клинической генодиагностике.

Заключение

Предлагаемый вариант симметричной ПЦР с последующим плавлением ДНК позволяет, с одной стороны, проводить количественную оценку числа копий анализируемых генов и, с другой, сканировать генные мутации в ДНК культивируемых клеток, тканей и парафиновых блоков. Метод прост и реализуется в «закрытом формате» (в одной пробирке

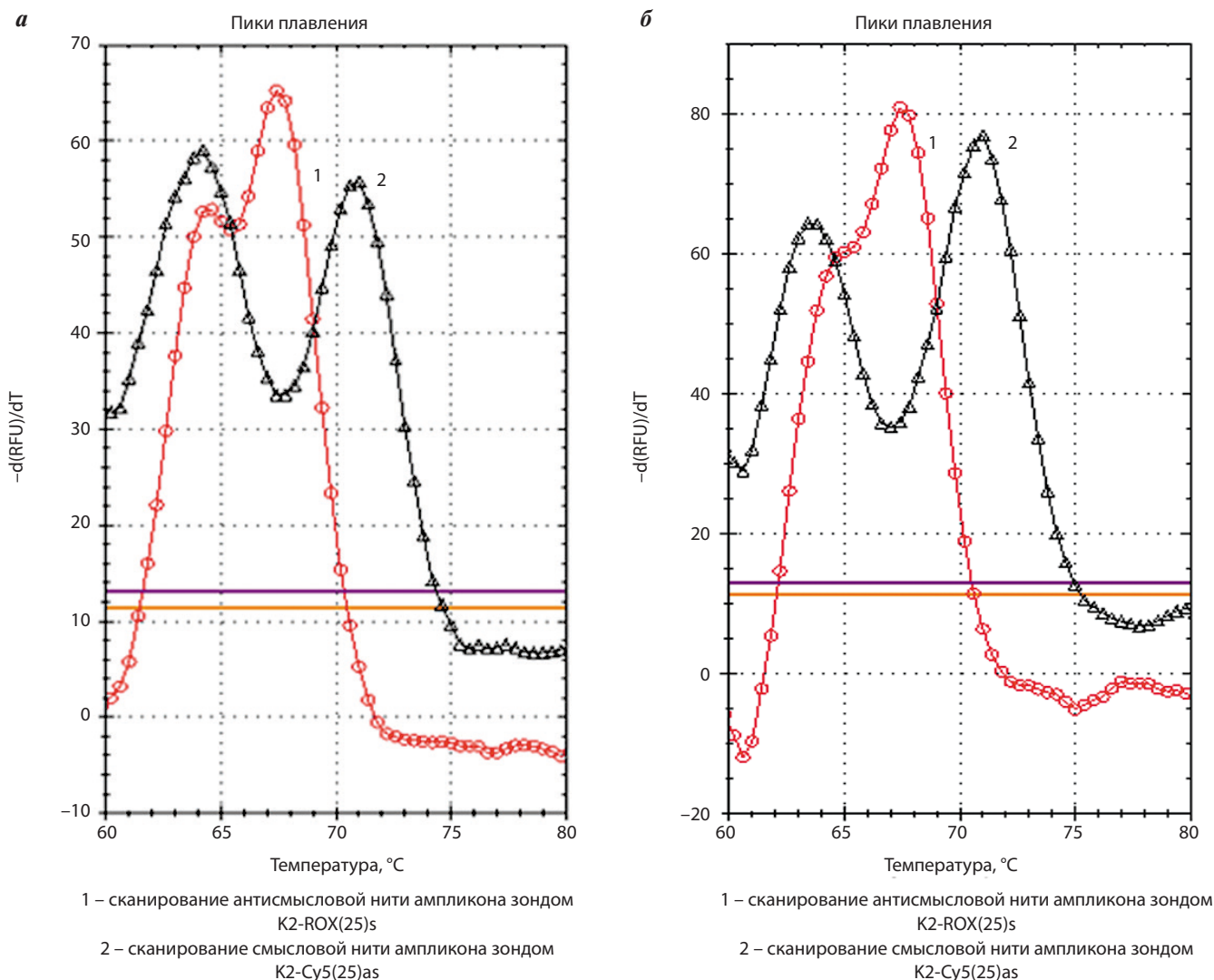


Рис. 6. Двунитевое мутационное сканирование онкогена *KRAS* в ДНК опухолевой ткани (рак толстой кишки), выделенной из парафиновых блоков: а – мутация GGT12GTT; б – мутация GGT12GCT (обозначения те же, что и на рис. 5)

без промежуточных или дополнительных процедур), минимизирующем риск перекрестного загрязнения клинических образцов. Одновременное двунитевое тестирование ампликона, повышающее надежность и чувствительность анализа, не требующее отказа от симметричного варианта ПЦР и, кроме того,

не сопряженное с дополнительными затратами времени и труда, может найти широкое применение в экспериментальном и клиническом генотипировании.

Подана заявка на изобретение № 2016128057 «Способ сканирования генных мутаций в опухолях человека» (приоритет от 12.07.2016).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012;72(10):2457–67.
2. Yang W., Shelton D.N., Berman J.R. et al. Droplet digital™ PCR: multiplex detection of KRAS mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal cancer samples. *Biotechniques* 2015;58:205–6.
3. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One* 2011;6(4):e19206.
4. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Optimization of melting analysis with TaqMan probes for detection of KRAS, NRAS and BRAF mutations. *Anal Biochem* 2015;491:75–83.
5. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Asymmetric real-time PCR and multiplex melting curve analysis with TaqMan probes for detecting PIK3CA mutations. *Data Brief* 2015;5:913–7.
6. Botezatu I.V., Panchuk I.O., Stroganova A.M. et al. TaqMan probes as blocking agents for enriched PCR amplification and DNA melting analysis of mutant genes. *Biotechniques* 2017;62(2):62–8.
7. Schutz E., von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 1999;27(6):1218–22.

8. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2766–70.
9. Yap E.P., McGee J.O. Nonisotopic discontinuous phase single strand conformation polymorphism (DP-SSCP): genetic profiling of D-loop of human mitochondrial (mt) DNA. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4155.
10. Guthrie P.A., Gaunt T.R., Abdollahi M.R. et al. Amplification ratio control system for copy number variation genotyping. *Nucleic Acids Res* 2011;39(8):e54.