

ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ



ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ



ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАРУШЕНИЯМИ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА, МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ). РУ 2010/08413

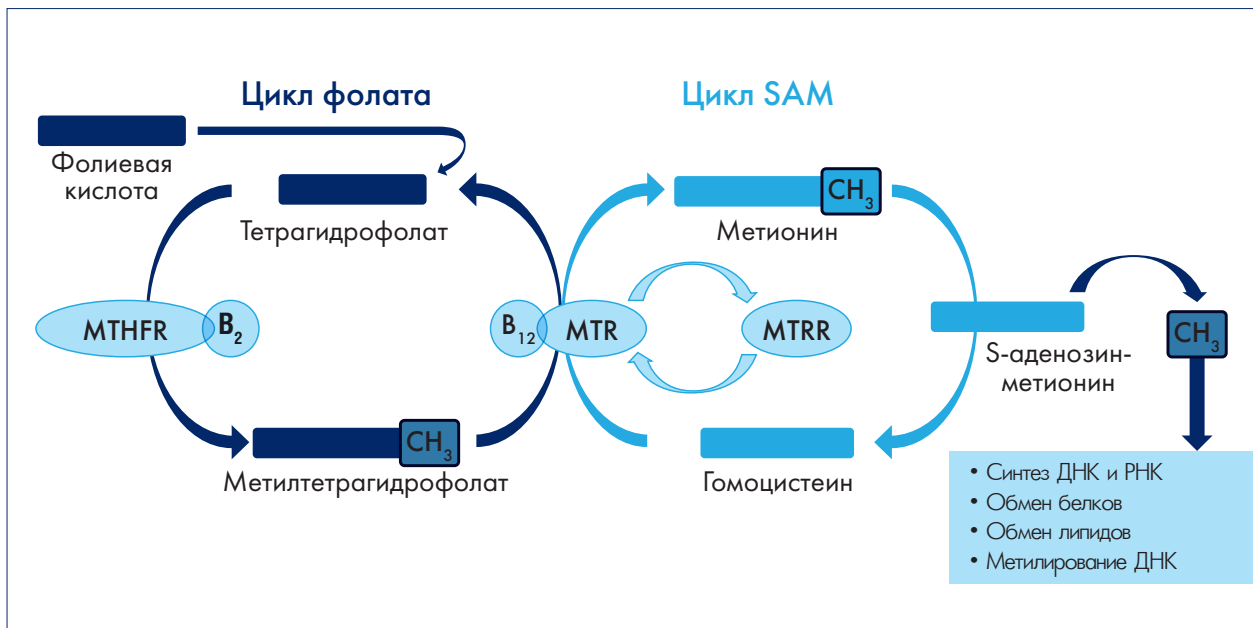
Фолиевая кислота – водорастворимый витамин В₉, производными которого являются **фолаты**.

Данная группа соединений играет ведущую роль в широком спектре жизненно важных процессов:

- ❖ стимулирует эритропоэз;
- ❖ участвует в синтезе аминокислот (в т. ч. метионина, серина, глицина), нуклеиновых кислот, пуринов, пиримидинов, витаминов;
- ❖ участвует в обмене холина, гистидина;
- ❖ является важным сопутствующим фактором в метилировании ДНК и РНК;
- ❖ способствует регенерации мышечной ткани;
- ❖ влияет на развитие быстрорастущих тканей (кожа, оболочки желудочно-кишечного тракта, костный мозг);
- ❖ выполняет защитную функцию при беременности по отношению к действию на плод тератогенных и повреждающих факторов;
- ❖ способствует нормальному созреванию и функционированию плаценты;
- ❖ фолиевая кислота имеет эстрогеноподобное действие, что позволяет снижать прием гормонов при заместительной гормональной терапии.

Данные функции реализуются в процессе метаболизма фолатов, который составляет основу фолатного цикла.

Фолатный цикл – каскадный процесс, контролируемый ферментами, которые в качестве коферментов имеют производные фолиевой кислоты. Ключевым этапом в данном процессе является синтез метионина из гомоцистеина. Это достигается в процессе превращения фолатов: восстановления 5,10-метилентетрагидрофолата до 5-метилтетрагидрофолата, несущего метильную группу, которая необходима для превращения гомоцистеина в метионин. Восстановление фолатов происходит при участии фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR). Метильная группа переносится на В12, который затем отдает ее гомоцистеину, образуя метионин с помощью фермента метионин-синтазы (MTR). Однако в некоторых случаях В12 может окисляться, что приводит к подавлению метионин-синтазы. Для поддержания активности фермента необходимо восстановительное метилирование с помощью фермента метионин-синтаза-редуктазы (MTRR).



Нарушение фолатного цикла приводит к накоплению гомоцистеина в клетках и повышению общего уровня гомоцистеина в плазме. Гомоцистеин обладает выраженным токсическим, атерогенным и тромбофилическим действием, что обуславливает повышенный риск развития ряда патологических процессов:

- ❖ **осложнения беременности** (фетоплацентарная недостаточность, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, поздний гестоз);
- ❖ **дефекты развития плода** (незаращение нервной трубки, анэнцефалия, деформации лицевого скелета);
- ❖ **пренатальная смерть плода;**
- ❖ **эктопия хрусталика;**
- ❖ **остеопороз;**
- ❖ **канцерогенез** (колоректальная аденома, рак молочной железы и яичников);
- ❖ **усиление побочных эффектов при химиотерапии;**
- ❖ **сердечно-сосудистые заболевания** (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, атеросклероз, атеротромбоз).

Причины нарушения фолатного цикла:

- ❖ генетические дефекты ферментов фолатного цикла MTHFR, MTR и MTRR;
- ❖ дефицит фолиевой кислоты;
- ❖ дефицит витаминов B6 и B12.

Анализ полиморфизмов в генах фолатного цикла позволяет определить предрасположенность к указанным выше патологическим процессам и дает возможность своевременного принятия мер посредством назначения корректирующей терапии.

Показания к генетическому анализу:

- ❖ повышенный уровень гомоцистеина в крови (гипергомоцистеинемия);
- ❖ невынашивание беременности, гибель плода во 2 и 3 триместрах беременности;
- ❖ рождение ребенка с изолированными пороками нервной трубки, сердца или урогенитального тракта;
- ❖ плановая подготовка к беременности;
- ❖ наличие ИБС, артериальной гипертензии, атеросклероза или атеротромбоза;
- ❖ тромбоэмболия;
- ❖ антифосфолипидный синдром;
- ❖ семейная предрасположенность к онкологическим заболеваниям;
- ❖ назначение химиотерапии;
- ❖ назначение оральных контрацептивов и гормональной заместительной терапии.

Технология анализа генетических полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms – SNPs)

В случае возникновения замены в нуклеотидной последовательности ДНК возможно обнаружение трех вариантов генотипа: гомозиготы с исходной последовательностью нуклеотидов, гетерозиготы и гомозиготы с заменой в последовательности нуклеотидов.

Технология **ПЦР с анализом кривых плавления** дает возможность идентифицировать фрагменты ДНК путем детекции изменений в уровне флуоресценции комплекса *фрагмент–проба* (меченный флуорофором олигонуклеотидный зонд) на этапе его денатурации и последующего построения графика кривой плавления.

Технология включает следующие этапы:

- ❖ амплификация искомой последовательности ДНК;
- ❖ гибридизация ампликонов с олигонуклеотидами (*пробами*), мечеными флуорофорами;
- ❖ образование *комплементарных* и *частично комплементарных* дуплексов;
- ❖ плавление (денатурация) дуплексов;
- ❖ детекция флуоресценции с последующим построением и анализом кривых плавления.

Для определения нуклеотидной последовательности, образовавшейся в процессе амплификации, используют метод *примыкающих проб* (*kissing probes* или *резонансный перенос энергии*).

В его основе лежит использование двух типов олигонуклеотидов (*проб*), гибридизующихся на матрицу при низкой температуре в непосредственной близости друг от друга. Один из олигонуклеотидов метят флуоресцентным донором, другой – акцептором (гасителем). Идентификация нуклеотидной последовательности образца осуществляется в процессе *плавления дуплексов* (результат гибридизации фрагментов ДНК и олигонуклеотидных зондов), которое происходит при последовательном увеличении температуры реакционной смеси.

Преимуществом данного подхода является *использование специфических флуорофоров*, снижающих риск детектирования неспецифических продуктов амплификации, как при использовании интеркалирующих красителей.

Компания «ДНК-Технология» предлагает уникальную технологию выявления и идентификации SNP методом ПЦР с анализом кривых плавления.

Преимуществами данной технологии являются:

- ❖ **Использование Taq-полимеразы, блокированной специфическими антителами**, на этапе амплификации искомого участка ДНК с праймерами, общими для обоих вариантов последовательности:
 - реализация «горячего старта» без применения парафина;
 - предотвращение неспецифического отжига праймеров;
 - повышение чувствительности комплектов реагентов.
- ❖ Для повышения надежности типирования компания «ДНК-Технология» использует **модификацию метода примыкающих проб**:
 - сиквенс-специфичные типизирующие олигонуклеотиды;
 - одновременная гибридизация с двумя альтернативными типизирующими зондами, меченными различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта искомой последовательности в одной пробирке в отличие от систем с интеркалирующими красителями, где для определения одного SNP необходимо использовать 2 пробирки для разделения аллельных вариантов.
- ❖ **Автоматическое генотипирование и интерпретация результатов в режиме реального времени** с использованием специализированного программного обеспечения.
- ❖ **Возможность визуальной интерпретации результатов** за счет определения разницы температур плавления не менее 4–5 °С для аллельных вариантов одного гена.

Компания «ДНК-Технология» разработала набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла, методом ПЦР в режиме реального времени (Генетика Метаболизма Фолатов).

Технические характеристики и состав набора реагентов

Количество тестов в наборе	48 тестов
Формат реагентов	Нераскапанный
Taq-АТ-полимераза	1 пробирка (96 мкл)
ПЦР-буфер	2 пробирки (по 960 мкл)
Масло минеральное	1 флакон (3,84 мл)
Определяемые полиморфизмы	1 пробирка MTHFR: 677 C>T – 960 мкл 1 пробирка MTHFR: 1298 A>C – 960 мкл 1 пробирка MTR: 2756 A>G – 960 мкл 1 пробирка MTRR: 66 A>G – 960 мкл
Материал для анализа	Цельная кровь
Срок годности	6 месяцев
Температура хранения	+2... +8 °С -20 °С (для Taq-АТ-полимеразы)

Технология:

- ПЦР-плавление;
- использование других технологических платформ не допускается.

Реагенты для выделения ДНК:

- ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА;
- ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА.

Минимальное количество ДНК для анализа:

1,0 нг на амплификационную пробирку.

Дополнительные реагенты:

реагенты для контроля качества ДНК (КВМ) – для детектирующего амплификатора ДТ-322.

Для проведения анализа необходимы следующие расходные материалы и оборудование:

- микропробирки (или микропробирки в стрипах) объемом 0,2 мл для ПЦР-анализа, адаптированные для работы с термоциклером в режиме реального времени;
- штатив и насадка на микроцентрифугу (вортекс) для стрипованного пластика.

Преимущества использования набора реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла, методом ПЦР в режиме реального времени:

- технологичность (стандартные методики ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени);
- высокая скорость (для определения генотипа пациента требуется не более суток);
- автоматическая выдача результатов (для приборов серии ДТ);
- низкая стоимость анализа;
- высокая чувствительность (технология позволяет достоверно отличать аллельные состояния гена друг от друга);
- одновременная детекция – в одной пробирке определяются два аллельных варианта гена;
- внутренний контроль (ВК) – позволяет оценить количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

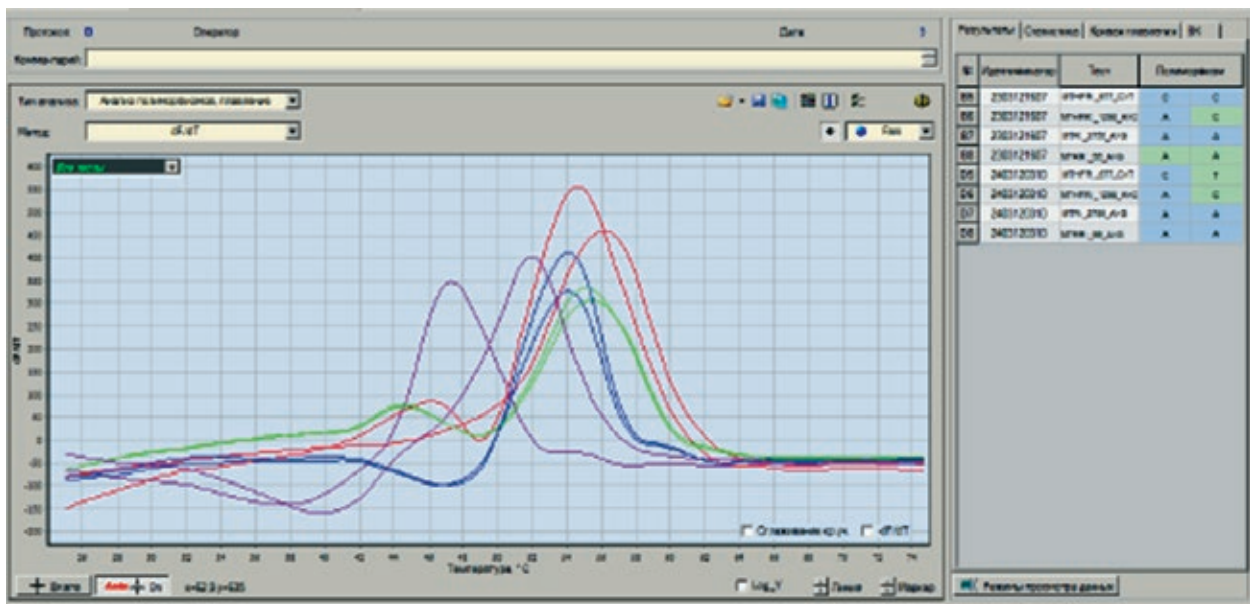
Оборудование, необходимое для проведения анализа

Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, оснащенных **детектирующими амплификаторами для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (приборы серии ДТ производства ООО «НПО ДНК-Технология»):** ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 (для ДТ-322 функция контроля количества ДНК в каждой пробирке не поддерживается) (рис. 1).



Рис. 1. Приборы производства компании «ДНК-Технология»

Приборы **серии ДТ** оснащены специально разработанным русскоязычным программным обеспечением, поддерживающим **автоматическую** обработку данных и выдачу результатов исследования в удобной для интерпретации форме. Уникальные технические характеристики приборов позволяют сократить время амплификации до 1 часа 20 минут, а общее время проведения анализа – до 2 часов 30 минут. Это значительно экономит время исследования и обеспечивает высокую пропускную способность лаборатории.



Кроме того, программа позволяет выдавать результаты в **удобной и наглядной форме** для анализа полученных данных врачами-клиницистами.

№	Наименование исследования	Результаты		Ср
1	MTFR:_677_C>T	C	C	27,0
2	MTFR:_1298_A>G	A	C	27,0
3	MTR:_2756_A>G	A	A	28,0
4	MTRR:_66_A>G	A	A	27,0
5	MTFR:_677_C>T	C	T	28,0
6	MTFR:_1298_A>G	A	C	28,0
7	MTR:_2756_A>G	A	A	27,5
8	MTRR:_66_A>G	A	A	27,0

Дополнительные исследования:

- определение уровня гомоцистеина в крови,
- определение уровня фолиевой кислоты,
- определение уровней В6, В12, В1 в крови,
- гемостазиограмма.

Генетические полиморфизмы, ассоциированные с нарушением фолатного цикла

Ген	Функция гена	Полиморфизм	Идентификатор *	Возможные генотипы	Ассоциации/эффекты
MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза	Кодирует 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазу – ключевой фермент фолатного цикла, восстанавливающую 5,10-метилентетрагидрофолат до 5-метилтетрагидрофолата (катализатор реакции образования 5-метилтетрагидрофолата, необходимого для превращения гомоцистеина в метионин)	677 C>T (A222V)	rs1801133	C/C	Без особенностей
				C/T	Снижение функциональной активности фермента до 60% от среднего значения. Дефицит MTHFR способствует тератогенному и мутагенному действию
				T/T	Без особенностей
MTR – B12-зависимая метионин-синтаза	Кодирует фермент, непосредственно осуществляющий метилирование гомоцистеина (обратное превращение гомоцистеина в метионин)	1298 A>C (E429A)	rs1801131	A/A	Без особенностей
				A/C	Снижение функциональной активности фермента до 35% от среднего значения. Дефицит MTHFR способствует тератогенному и мутагенному действию
				C/C	Без особенностей
MTRR – метионин-синтаза-редуктаза	Кодирует фермент, необходимый для поддержания активности метионин-синтазы путем восстановительного метилирования	2756 A>G (D919G)	rs1805087	A/A	Без особенностей
				A/G	Снижение функциональной активности фермента. Развивается умеренная степень гипергомоцистеинемии. Более выраженное снижение уровня гомоцистеина в плазме в ответ на повышение фолатов в пище.
				G/G	Без особенностей
MTRR – метионин-синтаза-редуктаза	Кодирует фермент, необходимый для поддержания активности метионин-синтазы путем восстановительного метилирования	66 A>G (I22M)	rs1801394	A/A	Без особенностей
				A/G	Снижение функциональной активности фермента. Усиливает гипергомоцистеинемия, вызываемую полиморфизмом 677C>T в гене MTHFR
				G/G	Без особенностей

*Обозначение в базе данных dbSNP Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI)





Контакты офиса:

ООО «ДНК-Технология» Адрес: Москва, Варшавское шоссе, д. 125 Ж, корп. 6
Тел./факс: (495) 980-45-55 www.dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru

Телефон горячей линии:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный)