

ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ЛАКТОЗЫ

ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ЛАКТОЗЫ

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

Лактоза — это молочный сахар, составляющий около 99% всех углеводов любого молока. Под действием фермента лактазы в желудочно-кишечном тракте лактоза расщепляется на глюкозу и галактозу, после чего происходит всасывание этих моносахаров. Если нерасщепленной лактозы в кишечнике слишком много (активность расщепляющей лактазы снижена), а молочнокислых бактерий недостаточно, то непереваренная лактоза провоцирует поступление воды из организма в полость кишечника, в результате чего возникает жидкий стул (диарея), боли, урчание, вздутие живота. Такое состояние называется лактазной недостаточностью (лактозной непереносимостью, ЛН).

По степени выраженности ЛН различают:

- ❖ частичную ЛН;
- ❖ полную ЛН.

По происхождению выделяют два основных вида ЛН:

- ❖ **первичная** ЛН подразделяется на:
 - врожденную (генетически обусловленную, семейную);
 - транзиторную (встречается у недоношенных детей);
 - ЛН взрослого типа;
- ❖ **вторичная** ЛН развивается в результате кишечных инфекций, а также любых заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Возникновение первичной врожденной мальабсорбции лактозы (алактазии новорожденных) и первичной врожденной мальабсорбции лактозы с поздним началом (у взрослых) связано с генетически детерминированным нарушением синтеза лактазы.

Первичная (врожденная) лактазная недостаточность, т.е. врожденное нарушение процесса выработки лактазы, встречается довольно редко. Истинная лактазная недостаточность обнаруживается только у 10% населения Земли. К регионам с высокой степенью пенетрантности гена лактазной недостаточности относятся Северная Америка, Африка, Юго-Восточная Азия, где частота дефекта фермента достигает 70–100%. В российской популяции частота дефицита лактазы наблюдается примерно у 16%.

ЛН взрослого типа возникает после периода грудного вскармливания (обычно снижение лактазной активности происходит к 3–5 годам, окончательный же лактазный фенотип формируется в широких возрастных пределах: к примеру, у японцев он формируется к 5–6 годам, у финнов — к 20–21 годам). В обоих вариантах первичной лактазной недостаточности биохимический механизм нарушений один и тот же, что указывает на их наследственную природу.

Процесс расщепления молочного сахара связан с активностью фермента лактаза-флоризингидролаза (лактаза или β-D галактозидгидролаза). Лактаза-флоризингидролаза кодируется единственным геном, локализованным на 2 хромосоме. Врожденное снижение активности лактазы — гиполактазия — наследуется по аутосомно-рецессивному механизму.

Доказано, что область гена **МСМ6** является одним из важных регуляторных элементов гена лактазы. Показана ассоциация с лактозной непереносимостью для полиморфизма **-13910 Т>С**.

Показания к генетическому анализу:

- ❖ дифференциальная диагностика лактозной непереносимости и других заболеваний желудочно-кишечного тракта у взрослых;
- ❖ обследование детей младшего возраста в период прекращения грудного вскармливания для предотвращения неожиданных расстройств кишечника, особенно при повышенной чувствительности к нагрузочным пробам.

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), меченными 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 $4-5^{\circ}\text{C}$ для аллельных вариантов одного гена.

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

Технические характеристики и состав набора реагентов

Количество тестов в наборе	48 тестов
Формат реагентов	Нераскапанный
Тaq-АТ-полимераза	1 пробирка (48 мкл)
ПЦР-буфер	2 пробирки (480 мкл)
Масло минеральное	2 пробирки (960 мкл)
Определяемые полиморфизмы	1 пробирка МСМ6: -13910 T>C — 960 мкл
Материал для анализа	Цельная кровь
Срок годности	6 месяцев
Температура хранения	+2 ... +8 °C –20 °C (для Тaq-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 обмена лактозы, 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.

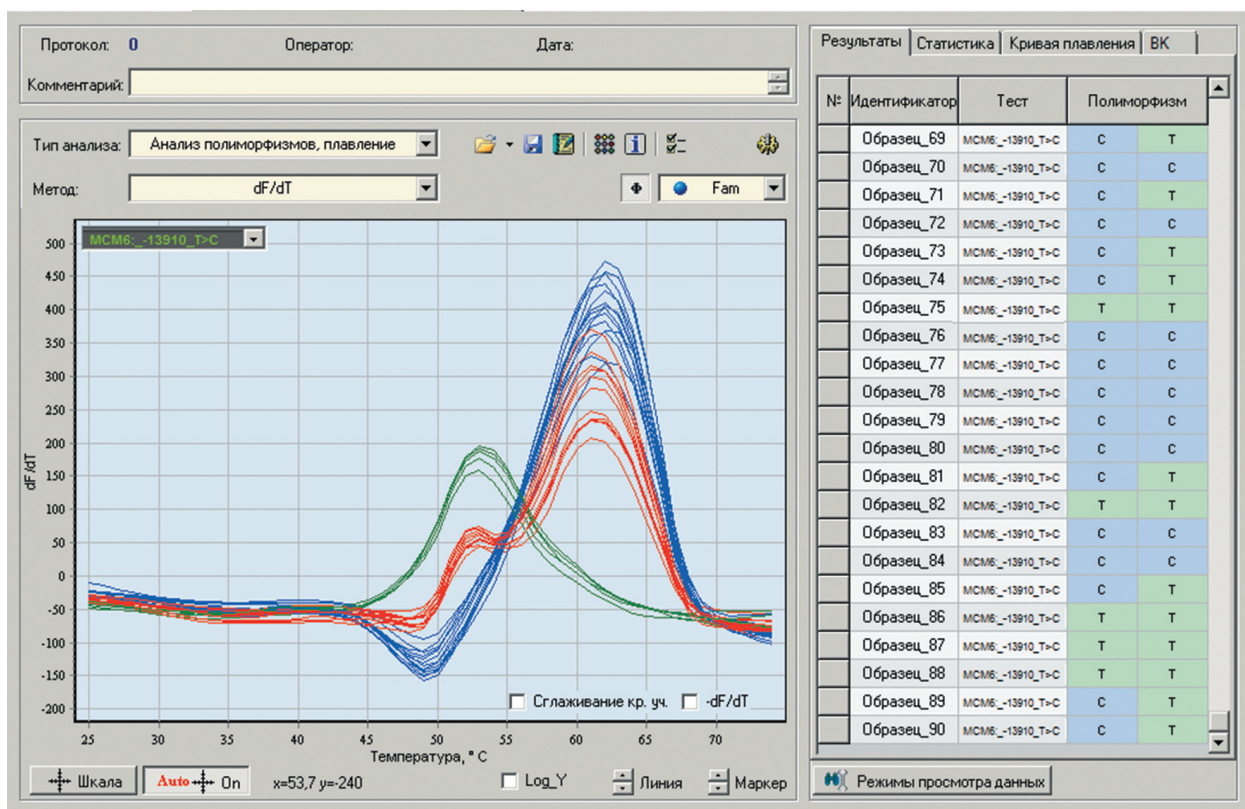
Оборудование, необходимое для проведения анализа

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).

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.



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



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

№	Наименование исследования	Результаты		Ср
		Т	С	
1	MCM6_-13910_T>C	Т	Т	30,0
2	MCM6_-13910_T>C	С	Т	30,0
3	MCM6_-13910_T>C	Т	Т	28,5
4	MCM6_-13910_T>C	С	Т	29,5
5	MCM6_-13910_T>C	С	С	30,0
6	MCM6_-13910_T>C	Т	Т	29,0
7	MCM6_-13910_T>C	Т	Т	28,0
8	MCM6_-13910_T>C	С	С	30,0

Дополнительные исследования:

- тест на толерантность к лактозе;
- элиминационная диета (диета без лактозы в течение двух недель);
- проба Бенедикта;
- тест на всасывание D-ксилозы;
- водородный дыхательный тест;
- исследование кала на углеводы, рН, молочную кислоту;
- тест с углеводной нагрузкой (определение концентрации глюкозы в плазме после приема лактозы);
- определение активности фермента щеточной каемки энтероцитов.

Генетические полиморфизмы, ассоциированные с нарушением обмена лактозы

Ген	Функция гена	Полиморфизм	Идентификатор*	Возможные генотипы	Ассоциации/эффекты
MCM6 — лактаза-флоризингидролаза	Кодирует фактор, который регулирует экспрессию гена LCT (ген лактазы), участвуя тем самым в процессе гидролиза дисахарида лактозы	-13910 T>C	rs 4988235	T/T C/T C/C	Без особенностей Снижение экспрессии гена MCM6. Снижение ферментативной активности, направленной на расщепление лактозы

* 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. 125Ж, корп. 6.
Тел./факс: +7 (495) 640-17-71. www.dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru.

Служба клиентской поддержки:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный), hotline@dna-technology.ru.