

Характеристика метода многолокусной метилчувствительной ПЦР в режиме реального времени

Научный руководитель – Танас Александр Сергеевич

Николаева Александра Федоровна

Студент (специалист)

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.

Пирогова, Москва, Россия

E-mail: alex.ru97@bk.ru

Введение. Коллективом лаборатории эпигенетики медико - генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова предлагается метод МЧ-кПЦР (метилчувствительная ПЦР на базе количественной ПЦР в реальном времени). Это качественный и количественный метод, который подразумевает одновременный анализ нескольких CpG-пар в границах ампликона. На сегодняшний день существует ряд альтернативных методов измерения уровня метилирования ДНК, основанные на бисульфитной конверсии[2], но в сравнении с МЧ-кПЦР, они имеют ряд ограничений. Одним из таких ограничений является деградация ДНК в ходе бисульфитной конверсии, что в дальнейшем может привести к затруднению амплификации[1].

Цель исследования. Охарактеризовать свойства метода разработанной многолокусной МЧ-кПЦР экспериментальным методом для количественного анализа уровня метилирования ДНК.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовали ДНК из лимфоцитов здоровых доноров. Считали, что ДНК, необработанная метилчувствительной рестриктазой *VstNI* (сайт узнавания GCG/C), является модельной метилированной матрицей (не гидролизуются) в то время как гидролизованная ДНК - модельной неметилированной матрицей. Для определения порога чувствительности использовали смеси гидролизованной и негидролизованной ДНК. За 0% метилирования принималось содержание в смеси только гидролизованной ДНК, за 100% метилирования - негидролизованной соответственно. Характеристика метода МЧ-кПЦР проводилась с учетом разработанных коллективом требований к дизайну: включение положительного внутреннего контроля эффективности ПЦР и контроля полноты гидролиза геномной ДНК метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции. Дизайн праймеров и TaqMan-зондов проводили с помощью программного обеспечения MPrimer. Специфичность и образование димеров оценивали с помощью MFPrimer и PriDimerCheck. Коэффициент детерминации R^2 использовали для оценки соотношения разведений и метода МЧ-кПЦР. Стандартные отклонения использовали в качестве метрики оценки погрешности измеренного зонда.

Результаты. Данные МЧ-кПЦР были проанализированы с помощью метода $Cy0$ и построенных на его основе диаграмм размаха. Оценивали метилирование в процентах отдельно для каждого локуса. Для всех локусов модельный уровень метилирования прямо коррелирует с уровнем метилирования, определенным методом $Cy0$. Коэффициент детерминации для локусов DC, PRKCB_2, SMDS_1 составляет, соответственно, 0,88, 0,89, 0,79. Стандартные отклонения метилирования в локусах DC, PRKCB_2, SMDS_1 составляют, соответственно, 14,31%, 10,66%, 9,69%.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности измерения уровня метилирования методом МЧ-кПЦР в режиме реального времени. Метод позволяет измерять уровень метилирования с аналитической чувствительностью лучшей, чем аналитическая чувствительность бисульфитного секвенирования по Сэнгеру. Предлагаемая

технология, обладая такими преимуществами, как простота и экономичность, имеет самостоятельное научное и практическое значение.

Источники и литература

- 1) Танас А.С. Анализ дифференциального метилирования геномов методами непредвзятого скрининга: дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2012.
- 2) Rajares, M. J. et al. Methods for analysis of specific DNA methylation status. Methods (2020) doi:10.1016/j.ymeth.2020.06.021.

Иллюстрации

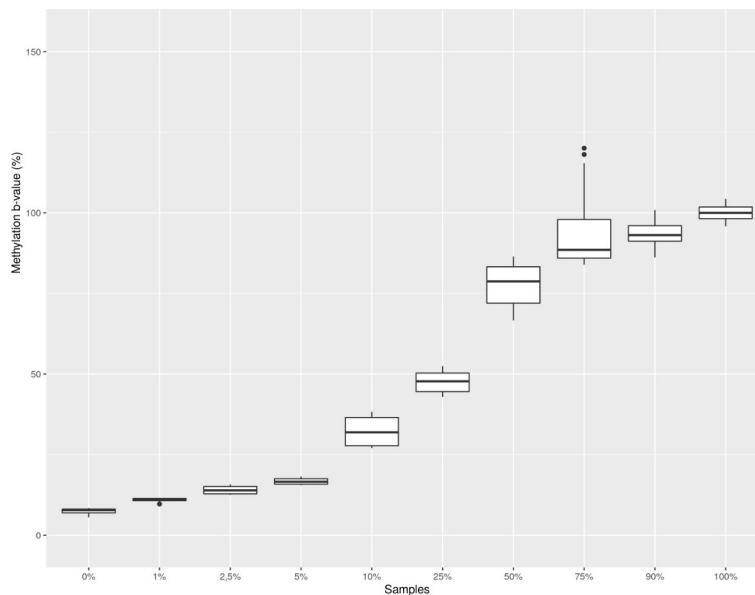


Рис. 1. Диаграмма размаха на примере локуса DC10_TMEM158 ($E = 1,51$)

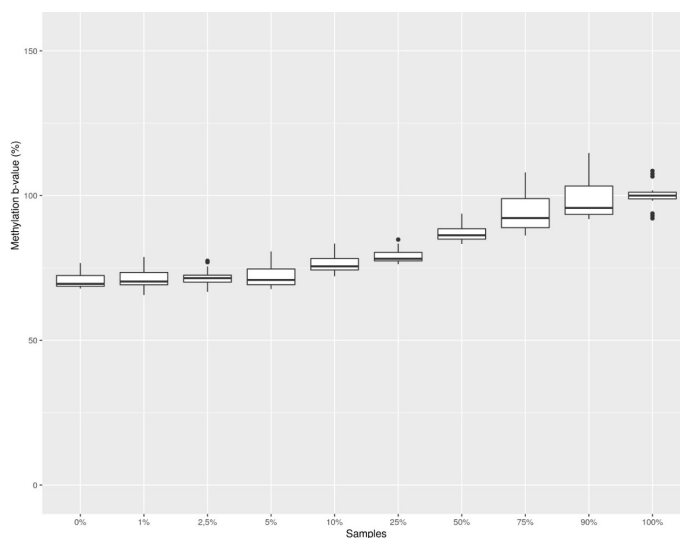


Рис. 2. Диаграмма размаха на примере локуса GMDS_1 ($E = 1,5$)

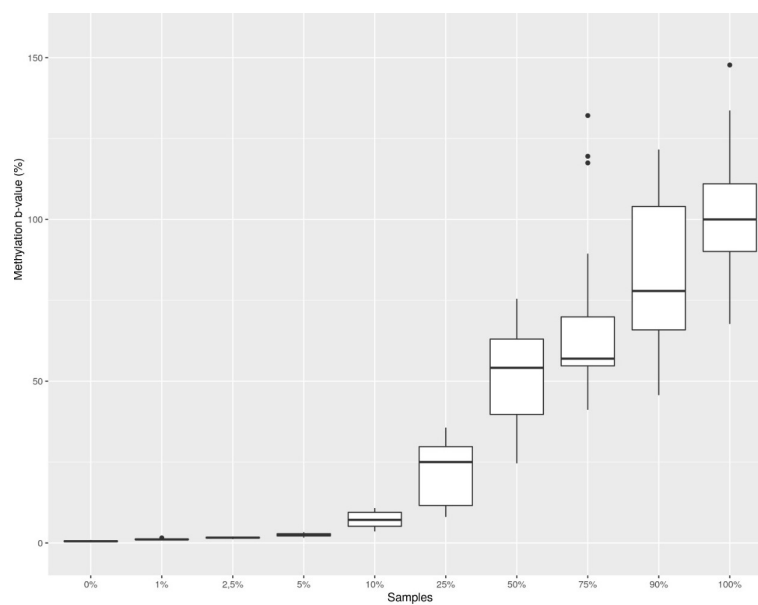


Рис. 3. Диаграмма размаха на примере локуса PRKCB_2 ($E = 1,58$)