© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616-006.04:575.24/.25.086

О.П. Дрибноходова[1], К.О. Миронов[1], Е.А.Дунаева[1], И.А. Демидова[2], А.А. Баринов[1], Я.А. Войцеховская[1], М.Л. Маркелов[1], Г.А. Шипулин[1]

ВЫЯВЛЕНИЕ АКТИВИРУЮЩИХ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ KRAS МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

[1]ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва; [2]Московская городская онкологическая больница № 62, 143423, Московская обл.

Разработана методика для детекции всех возможных вариантов мутаций в 12, 13 и 15-м кодонах гена KRAS на основе технологии пиросеквенирования. Определены аналитические характеристики разработанной методики: предел детекции для мутаций G34T, G35A и G38A, определенный на клонированных контрольных образцах, составил 3%; уровень фона (Limit of Blank) для разных мутаций составил от 0,3 до 4,1%. Проведена апробация системы на клинических образцах, идентифицировано и определено в количественном формате 7 различных типов мутаций, расхождений данных пиросеквенирования с результатами секвенирования по Сэнгеру не обнаружено.

Ключевые слова: *KRAS, пиросеквенирование, соматические мутации, колоректальный рак*

O.P. Dribnokhodova, K.O. Mironov, Ye.A. Dunayeva, I.A. Demidova, A.A. Barinov, Ya.A. Voytsekhovskaya, M.L. Markelov, G.A. Shipulin

THE DETECTION OF ACTIVATING SOMATIC MUTATIONS IN GENE KRAS USING PYROSEQUENCING TECHNIQUE

The technique to detect all possible variants of mutations in 12, 13 and 15 codons of gene KRAS was developed om the basis of the pyrosequencing technology. The analytical characteristics of the developed technique were identified. The limit of detection for mutations G34T, G35A and G38A detected on the cloned control samples consisted 3%. The limit of blank for various mutations consisted from 0.3% to 4.1%. The system was tested on clinical samples. The 7 different types of mutations were identified and detected in quantitative format. No discrepancy of pyrosequencing data with results of sequencing according Sanger was established.

Key words: *KRAS, pyrosequencing, somatic mutation, colorectal cancer*

Введение. Наличие мутаций в 12–13-м, а также в 15, 61 и 146-м кодонах гена KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue) коррелирует с высоким риском устойчивости опухоли к моноклональным антителам и ингибиторам рецептора эпидермального фактора роста [5]. Частота мутаций в гене KRAS достигает 40% при колоректальном раке и 20% при раке легких [6, 10, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/]. В связи с этим выявление активирующих соматических мутаций в гене KRAS является актуальной задачей, влияющей на выбор терапии.

Материалы и методы. Для выявления мутаций в гене KRAS был использован метод определения нуклеотидной последовательности, основанный на пиросеквенировании [7].

Оптимизацию условий ПЦР и пиросеквенирования, а также определение аналитических характеристик системы проводили с использованием "ПКО ДНК человека" (ФБУН ЦНИИЭ) и на образцах ДНК клонированного контроля, содержащих участки гена KRAS без мутаций и с мутациями G34T, G35A, G38A. Клонирование проведено по стандартной методике [8] в вектор pGem-T ("Promega", США). Мутагенез проводили с помощью набора "QuikChange II Site-Derected Mutagenesis Kit" ("Agilent Technologies", США). Концентрацию ДНК определяли методом ПЦР-РВ с праймерами к последовательности вектора и реагентами производства ФБУН ЦНИИЭ. Для каждой мутации анализировали смеси, содержащие 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 7, 5 и 3% соответствующего клонированного контроля с клоном дикого типа, в реакцию вносили около 3000 копий ДНК (эквивалентно 10 нг геномной ДНК человека). В каждой точке разведений тестировали не менее 5 проб, полученных в двух независимых разведениях.

Для тестирования системы использовали 24 образца ДНК, выделенной из клеток периферической крови набором "РИБО-преп" (ФБУН ЦНИИЭ), и 44 образца опухолевой ДНК, полученных из срезов парафиновых блоков операционных и/или диагностических биопсий пациентов с колоректальным раком. ДНК выделяли после обработки тканей протеиназой К методом фенол-хлороформной экстракции или с помощью набора "QIAmp DNA FEPE Tissue Kit" ("Qiagen", Германия). Предварительное исследование на наличие мутаций проводили методом ПЦР с высокоразрешающим плавлением и последующим секвенированием. Концентрацию выделенной ДНК определяли методом ПЦР-РВ с праймерами к гену β-глобина (набор "АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL", ФБУН ЦНИИЭ) согласно инструкции к набору. Образцы с высокой концентрацией разводили до 300 копий/мкл, образцы с низкой (менее 150 копий/мкл) концентрацией тестировали в 3 повторах.

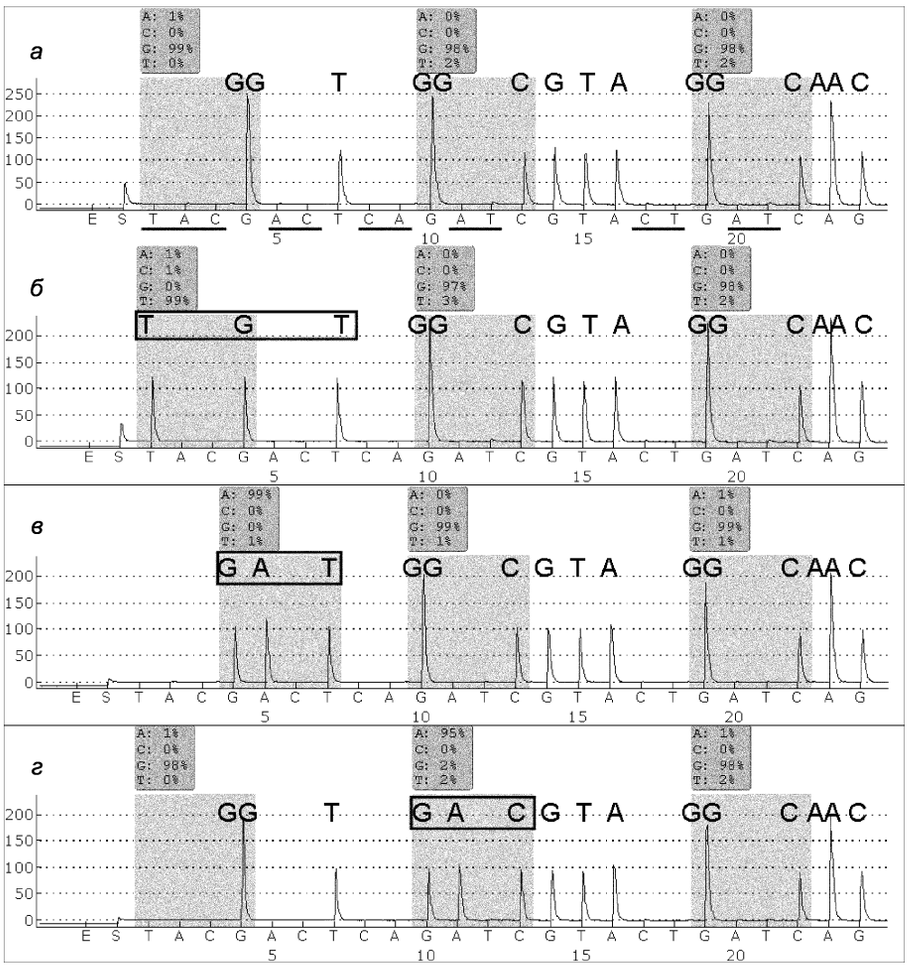
Все разведения клонированных контролей и клинические образцы были секвенированы методом Сэнгера с использованием реагентов и оборудования фирмы "Applied Biosystems" (США).

Праймеры для проведения пиросеквенирования были подобраны к последовательности второго экзона гена KRAS в соответствии с рекомендациями фирмы "Qiagen" к дизайну тестов для систем "PyroMark" [1]. Последовательности праймеров: KR-F1: 5`-AAG-GCC-TGC-TGA-AAA-TGA-CTG-3`, KR-R1: 5`-Biotin-AAA-GAA-TGG-TCC-TGC-ACC-AGT-A-3`, KR-S1: 5`-CTT-GTG-GTA-GTT-GGA-GCT-3`. Длина фрагмента 172 п. о.

ПЦР проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси, которая включала 5 мкл смеси, содержащей амплифици-

Для корреспонденции:

Дрибноходова Ольга Павловна, канд. биол. наук, науч. сотр.
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Телефон: (495) 305-54-24
E-mail: Dribnokhodova@pcr.ru



Пример детекции последовательности дикого типа и мутантных аллелей гена KRAS.

а – клон дикого типа, *б* – клон с мутацией G34T, *в* – клон с мутацией G35A, *г* – клон с мутацией G38A. По оси абсцисс – последовательность добавления нуклеотидов; по оси ординат – уровень сигнала. Над пирограммами обозначена секвенированная нуклеотидная последовательность. На рис. *а* подчеркнуты нуклеотиды, отсутствующие в последовательности гена KRAS дикого типа. Кодоны, в которых локализованы мутации, выделены рамкой.

рующие праймеры (по 1 пмоль/мкл каждого) и dNTP (0,88 мМ), 0,5 мкл реактива полимераза TaqF, 10 мкл реактива 2,5х ПЦР-буфера blue и 10 мкл ДНК-пробы. Все реагенты были произведены ФБУН ЦНИИЭ. Амплификацию проводили на амплификаторе "Терцик" (НПФ "ДНК-Технология", Россия) по программе: 95°С 15 мин; 45 циклов 95°С 10 с, 60°С 10 с, 72°С 15 с; 72°С 2 мин.

Для проведения пиросеквенирования использовали 10 мкл продукта амплификации, пробоподготовку проводили с использованием реактивов "Пиропреп" (набор "АмплиСенс® Пироскрин", ФБУН ЦНИИЭ). Анализ проводили на приборе "PyroMark Q24" ("Qiagen", Германия) с использованием секвенирующего праймера (0,3 мкМ) и реактивов "PyroMark Gold Q96 Reagents" ("Qiagen", Германия). Секвенируемый участок включал 12–16-й кодон гена KRAS. В каждый анализ включали образец "ПКО ДНК человека". Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения "PyroMark Q24" ("Qiagen", Германия).

Статистические расчеты и графические построения выполнены с помощью программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics 19.

Результаты и обсуждение. Последовательность нуклеотидов при пиросеквенировании была рассчитана так, чтобы можно было определять все мутации в 12, 13 и 15-м кодонах KRAS [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/]. При анализе результатов использовали две последовательности для анализа для мутаций в 35, 38 и 43-м или в 34, 37 и 44-м положениях KRAS соответственно: GG/A/C/TTGG/A/T/CCGTAG/A/T/CGCAAG-AGTGCCTTGAC и G/A/C/TGTG/A/T/CGCGTAGG/A/T/CCAAGAGTG CCTTGAC. При анализе образцов, содержащих последовательность гена KRAS дикого типа (препарат ПКО и клон дикого типа), средний уровень сигнала одиночного пика составил 80–120 условных единиц (см. рисунок).

Для оценки аналитических характеристик системы определяли параметры LOB (Limit of Blank) – наибольший сигнал, который может быть получен при измерениях образца, не содержащего тестируемого материала, и LOD (Limit of Detection) – наименьшая концентрация тестируемого материала, которая может быть достоверно дифференцирована от значения LOB [2, 3].

Определение LOB проводили на 93 образцах, содержащих участок гена KRAS дикого типа. Уровень LOB для разных мутаций составил от 0,27% (для G37C) до 4,13% (для G38T).

Предел детекции определяли на панели разведений клонированных контролей. Для трех проанализированных мутаций (G34T, G35A и G38A) пробы, содержащие 3% мутантного клона, можно было достоверно отличить от образцов, не несущих мутаций. При секвенировании методом Сэнгера можно было уверенно выявлять наличие мутации только в разведениях, содержащих более 10% мутантного аллеля, что согласуется с данными литературы, согласно которым его чувствительность при определении соматических мутаций не превышает 10–20% [4, 9].

В случае мутации G34T при тестировании проб, содержащих 3% мутантного аллеля, средний уровень детектируемого сигнала составил 3,5% аллеля T, при этом все измерения попали в диапазон от 2,5 до 4,5% мутантного аллеля, что значительно выше уровня LOB (1,12%). При оценке результатов измерений доли мутантного аллеля по всем точкам разведения была обнаружена высокая корреляция между ожидаемой и измеренной долей генотипа T (коэффициент корреляции по Спирмену 0,984), что позволяет с высокой точностью количественно определять наличие мутации.

Средний уровень сигнала, детектируемого при тестировании разведений, содержащих 3% аллеля G35A, составил 5,7% (от 2,8 до 10%), коэффициент корреляции между ожидаемой и измеренной долей мутации составил 0,978. Для мутации G38A уровень сигнала составил 3,6% (от 2,8 до 4,7%), коэффициент корреляции – 0,985.

При исследовании 24 образцов геномной ДНК человека проб, содержащих мутации в 12–15-м кодоне гена KRAS, не обнаружено. Уровень детектируемого сигнала во всех случаях не превышал LOB.

При тестировании 44 проб опухолевой ДНК, выделенных из образцов колоректального рака, было выявлено 34 пробы, содержащие 7 различных мутаций: G34C, G34A, G34T, G35T, G35A, G35C и G38A. Доля мутантного аллеля находилась в диапазоне от 8 до 61%. В десяти пробах мутаций в 12–15-м

кодоне обнаружено не было, уровень детектируемого сигнала не превышал LOB. Совпадение с результатами секвенирования методом Сэнгера составило 100%.

Заключение. Разработанная система генетического исследования позволяет однозначно определять нуклеотидную последовательность 12–16-го кодона гена KRAS и, таким образом, идентифицировать все возможные варианты мутаций в 12, 13 и 15 кодонах гена KRAS. В каждом эксперименте следует тестировать контрольный образец, не содержащий мутаций в гене KRAS. Пробы с низкой концентрацией ДНК целесообразно тестировать в трех повторах. Если уровень сигнала образца ниже LOD, но выше значения LOB, пробу необходимо анализировать повторно.

Определены аналитические характеристики разработанной системы для детекции мутаций в гене KRAS для разных мутаций в анализируемых локусах на клонированных контролях. Предел детекции для мутаций G34T, G35A и G38A составил 3%. При апробации системы на клинических образцах созданный алгоритм проведения анализа и интерпретации результатов позволил идентифицировать все варианты наблюдаемых мутаций в количественном формате. Совпадение с результатами секвенирования по Сэнгеру составило 100%.

Авторы выражают благодарность проф. А.Е. Платонову за помощь в статистической обработке результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А.* // Современные медицинские технологии. 2011; 6: 39–41.
2. *Armbruster D.A., Pry T.* // Clin. Biochem. Rev. 2008; 29. Suppl (i): 49–52.
3. Clinical and laboratory standards institute: Document EP 17: Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation // CLSI Approved Guideline. Wayne. PA USA. 2004.
4. *Gao J., Li Y.-Y., Sun P.-N., Shen L.* // World J. Gastroenterol. 2010; 16(38): 4858–64.
5. *Linardou H., Dahabreh I.J., Kanaloupiti D.* et al. // Lancet Oncol. 2008; 9(10): 962–72.
6. *Riely G.J., Marks J., Pao W.* // Proc. Am. Thorac. Soc. 2009; 6(2): 201–5.
7. *Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P.* // Science. 1998; 281(5375): 363–5.
8. *Sambrook J., Russell D.* // New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. *Tsiatis A.C., Norris-Kirby A., Rich R.G.* et al. // J. of Mol. Diag. 2010; 12(4): 425–32.
10. *Vaughn C.P., Zobell S.D., Furtado L.V.* et al. // Genes Chromosomes Cancer. 2011; 50(5): 307–12.

Поступила 25.06.12

ЗАМЕТКИ ИЗ ПРАКТИКИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.98:579.852.13]-06:616-002.36-02:617-001]-078

Ю.А. Жевлакова, О.И. Хохлова, В.М. Семенихина, И.М. Устьянцева

ДИАГНОСТИКА АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, У ПАЦИЕНТА С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ ФЛЕГМОНОЙ (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

Федеральное государственное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение Научно-клинический центр охраны здоровья шахтеров, г. Ленинск-Кузнецкий

Представлено редкое клиническое наблюдение анаэробной газообразующей инфекции, вызванной Clostridium perfringens. Заболевание закончилось летальным исходом на 4-е сутки после поступления.
Для успешного лечения важна своевременная диагностика клостридиальной инфекции, основанная на комплексе микробиологических, клинических и лабораторных данных. Ранняя диагностика возможна при бактериологическом исследовании нативного материала.

Ключевые слова: *анаэробная инфекция, газовая гангрена, бактериологическое исследование*

Yu.A. Jevlakova, O.I. Khokhlova, V.M. Semenikhina, I.M. Ustiyantseva

THE DIAGNOSTIC OF ANAEROBIC INFECTION INDUCED BY CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN PATIENT WITH POST-TRAUMATIC PHLEGMON: A CLINICAL CASE

The research clinical center of miners' health, Leninsk-Kuznetskiy, Russia

The article presents uncommon clinical case of anaerobic gas-producing infection induced by Clostridium perfringens. The disease resulted in lethal outcome at fourth day after admission of patient into hospital. The successful treatment requires timely diagnostic of clostridium infection based on complex of microbiologic, clinical and laboratory data. The early diagnostic is possible in case of bacteriologic analysis of native material.

Key words: *anaerobic infection, gas gangrene, bacteriologic analysis*

Для корреспонденции:
Устьянцева Ирина Марковна, д-р биол. наук, проф.
Адрес: 652509, Кемеровская обл., Ленинск-Кузнецкий, 7-й микр-н, 9
Телефон: 8(38456) 2-38-88
E-mail: irmaust@gnks.kuzbass.net

Раневая анаэробная клостридиальная (газовая) инфекция – острое, тяжелое инфекционное осложнение, которое вызывается инвазией в рану и размножением в ней клостридий. Возбудителями анаэробной инфекции считаются: Clostridium perfringens, C. oedematiens, C. septicum (основная причина спонтанных нетравматических газовых гангрен), C.