

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕТАЛЬНОЙ ДНК В КРОВОТОКЕ МАТЕРИ НА АМПЛИФИКАТОРЕ qTOWER 2.2

П.Горелов, к.б.н., AWTech, info@awt.ru

А.Балацкий, ООО "Университетская медицина"

В 1997 году впервые обнаружено присутствие фетальной внеклеточной ДНК в плазме и сыворотке беременных женщин [1]. Это открытие послужило стимулом к интенсивному изучению плодной ДНК в качестве потенциального маркера для неинвазивной пренатальной (дородовой) диагностики. В работе определяли концентрацию фетальной внеклеточной ДНК с использованием метода ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе qTOWER 2.2 (Analytik Jena, Германия).

Первые работы по изучению фетальной внеклеточной ДНК (внДНК) в крови матери как маркера для неинвазивной пренатальной диагностики были направлены на обнаружение последовательностей Y-хромосомы в крови беременных женщин для идентификации плода мужского пола с целью дородовой диагностики заболеваний, сцепленных с полом [2]. Известно, что до седьмой недели беременности чувствительность определения локусов Y-хромосомы методом обычной ПЦР составляет 95%, а при использовании ПЦР в реальном времени пол эмбриона с точностью 100% можно определить уже на пятой неделе развития.

Важнейшая функция пренатальной диагностики – своевременное определение у плода хромосомных заболеваний [3]. Известно, что уровень фетальной ДНК в плазме и сыворотке матери при вынашивании плода с синдромом Дауна повышается в среднем в два раза. В 1999 году обнаружено почти пятикратное повышение внДНК плода в кровотоке матери при преэклампсии (патология при беременности) по сравнению с группой женщин с нормально протекающей беременностью [4]. Увеличение концентрации фетальной ДНК в крови матери описаны и при других нарушениях тече-

ния беременности, таких как начавшийся самопроизвольный выкидыш в первом триместре, преждевременные роды [5], истинное приращение плаценты, гестоз, многоводие, гиперемезис [6]. В ряде работ [7, 8] отмечено, что повышение концентраций фетальной внДНК на ранних сроках беременности может служить маркером ранней диагностики осложнений беременности. Выявлено большое количество сайтов, различным образом метилированных у матери и плода. В 2009 году обнаружена чувствительность к метилированию

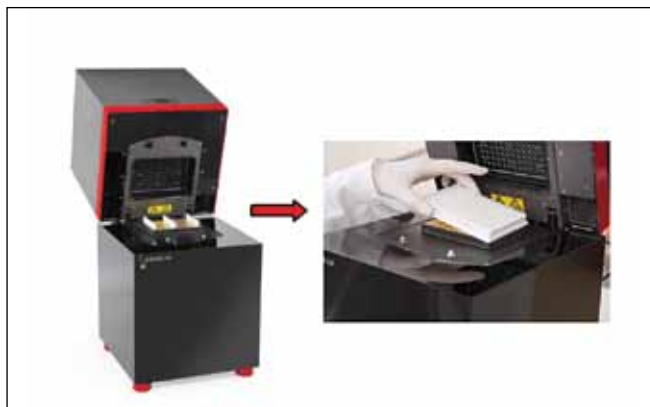


Рис.1. Реал-тайм амплификатор qTOWER 2.2

рестриктазы BstU I для селективного разрушения гиперметилированного у матери гена RASSF1A. Таким способом фетальная вДНК в кровотоке матери может определяться количественно, что важно для ранней доклинической диагностики осложнений беременности [9–12].

Перспективный способ оценки количества фетальной вДНК заключается в эпигенетическом подходе, который не затрагивает первичную структуру ДНК, а изменяет активность определенных генов. В эпигенетических исследованиях используется широкий спектр методов молекулярной биологии, в том числе – чувствительные к метилированию рестриктазы. Этот метод мы реализовали в режиме реального времени на амплификаторе qTOWER 2.2 (рис.1).

Для оценки количества фетальной вДНК при помощи эпигенетического метода использовали чувствительную к метилированию рестриктазу Bsh1236I фирмы Fermentas (Латвия). ДНК выделяли из цельной венозной крови с помощью центрифужных фильтров, используя набор innuPure Blood DNA Midi Kit, AnalytikJena. К 1 мкл раствора ДНК добавляли 1,5 мкл буфера для рестрикции, 10 единиц активности указанной рестриктазы и деионизованную воду до объема 15 мкл. Рестриксию проводили в термощейкере (BioSchake iQ) при 37°C в течение 16 ч. Далее с целью количественного определения гена RASSF1A проводилась ПЦР в реальном времени на qTOWER 2.2 с использованием праймеров RSF-F (5'-AGC CTG AGC TCA TTG AGC TG-3') и RSF-R (5'-ACC AGC TGC CGT GTG G-3'), а также зонда RSF-probe (FAM-5'-CCA ACG CGC TGC GCA T -3'-RTQ1). В качестве внутреннего контроля использовалось определение гена "домашнего хозяйства" (актина) при помощи праймеров Actin-F (5'-GCG CCG TTC CGA AAG TT-3') и Actin-R (5'-CGG CGG ATC GGC AAA-3'), а также зонда Actin-probe (R6G-5'-ACC GCC GAG ACC GCG TC -3'-RTQ1). Применялась реакционная смесь Maxima Probe qPCR Master Mix (Fermentas, Латвия). После денатурации (95°C, 3 мин) проводили амплификацию из 45 циклов, каждый из которых включал денатурацию (95°C, 10 с) и отжиг-элонгацию (60°C, 40 с). Количество фетальной вДНК измерялось в геном-эквивалентах, в качестве стандартов использовалась геномная ДНК человека. Концентрация геномной ДНК измерялась на спектрофотометре ScanDrop 250, за 1 геном-эквивалент принималось 6,6 пг ДНК.

В результате мы определили количество фетальной вДНК, содержащейся в кровотоке матери. Для этого ген RASSF материнской ДНК селективно расщепили, а аналогичный ген плодной ДНК коли-

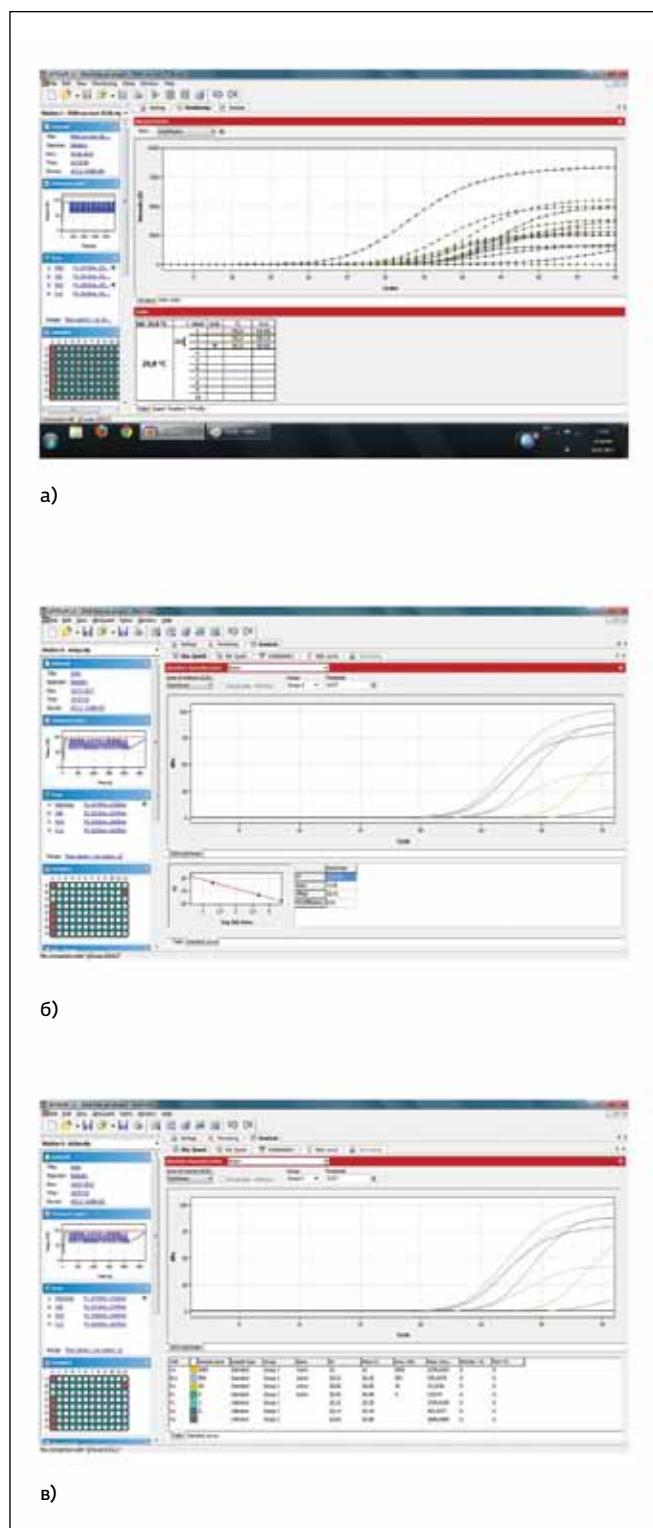


Рис.2. Кривые амплификации и окна количественного анализа: а – программа амплификации и кинетические кривые флуоресценции в двух каналах; б – пример калибровочного графика; в – окно количественного анализа с таблицей результатов. Указаны рассчитанные концентрации для стандартов и исследуемых образцов (фото с монитора)

Результаты исследования крови на содержание вДНК

Номера обследованных пациенток									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Концентрации фетальной вДНК в кровотоке матерей в геном-эквивалентах									
446760	43770	88178	78887	77985	88725	569761	55733	43434	43567

чественно определили при помощи амплификатора qTOWER 2.2 в режиме реального времени с использованием программного обеспечения qPCRsoft1.1. На рис.2 представлены кривые плавления амплификации гена RASSF и окна количественного анализа. Эффективность реакции ПЦР составила 0,91. Амплификатор qTOWER 2.2 отлично справился с поставленной задачей в режиме реального времени.

Для построения калибровочной кривой использовали четыре разведения геномной ДНК (2500, 500, 100 и 20 геном-эквивалентов). Полученные концентрации фетальной вДНК переводили в геном-эквиваленты на 1 мл крови и сопоставляли с клиническими данными. Проведено исследование крови 10 пациенток на количественное содержание фетальной вДНК (см. таблицу). Из таблицы видно, что в кровотоке матерей под номерами 1 и 7 почти пятикратное повышение фетальной вДНК плода по сравнению с группой женщин с нормально протекающей беременностью (2-6, 8-10). Именно у пациенток под номерами 1 и 7 развилось осложнение беременности в виде гестоза.

Таким образом, выявлено и подтверждено клинически, что при увеличении концентрации фетальной вДНК в кровотоке матери возникает риск развития осложнений беременности. Поэтому реал-тайм амплификатор qTOWER 2.2 рекомендуется для измерения концентрации фетальной вДНК в кровотоке матери по гену RASSF1A, который служит маркером ранней диагностики осложнений беременности.

ЛИТЕРАТУРА

- Lo Y.M.D., Corbetta N., Chamberlain P.F. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. - *Lancet* 1997, v.350, №9076, p.485-487.
- Farina A., Caramelli E., Concu M. et al. Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10-12 completed weeks gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening. - *Prenatal Diagnosis*, 2002, v.22, №3, p.148-152.
- Gahan P., Swaminathan R. et al. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum V. - *Annals of the New York Academy of sciences*, 2008, v.1137, p.1-6.
- Lo Y.M.D., Leung T.N., Tein M.S.C. et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. - *Clinical Chemistry*, 1999, v.45, p.184-188.
- Farina A., Leshane E. S., Romero R. et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. - *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2005, v.193, №2, p.421-425.
- Sekizawa A., Jimbo M., Saito H. et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. - *Clinical Chemistry*, 2002, v.48, №2, p.353-354.
- Zhong X.Y., Holzgreve W., Hahn S. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. - *Swiss Medical Weekly*, 2001, v.131, № 5-6, p.70-74.
- Zhong X.Y., Bürk M.R., Troeger C., Jackson L.R., Holzgreve W., Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. - *Prenatal Diagnosis*, 2000, v.20, №10, p.795-798.
- Richter A.M., Pfeifer G., Dammann R. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. - *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, v.1796, №2, p.114-128.
- Sekizawa A., Sugito Y. Detection and Quantification of Fetal DNA in Maternal Plasma by Using LightCycler. - *Technology Prenatal Diagnosis Methods in Molecular Biology*, 2003, v.444, p.231-238.
- Leung T.N., Zhang J., Lau T.K. et al. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. - *Lancet*, 1998, v.352, p.1904-1905.
- Самоходская Л.М., Балацкий А.В., Садекова О.Н., Татарина О.В. и др. Молекулярно-генетический анализ предрасположенности человека к мультифакторным заболеваниям. Монография./Под ред. акад. РАН и РАМН В.А.Ткачука - М.: Изд-во Московского университета, 2011.