

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РИСКА РАЗВИТИЯ ТРОМБОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЕТОДОМ МИНИСЕКВЕНИРОВАНИЯ: НАБОР РЕАГЕНТОВ “SNP2-TMG”

© 2025 г. А. В. Грудо*, И. В. Гайдукевич, Г. В. Сергеев

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220084 Республика Беларусь
*e-mail: vasilevskaya.av@gmail.com

Поступила в редакцию 16.07.2024 г.

После доработки 23.09.2024 г.

Принята к публикации 27.09.2024 г.

Одной из причин возникновения сердечно-сосудистых заболеваний является воздействие генетических факторов тромбогенного риска. Нарушения в генах системы гемостаза и фолатного цикла могут приводить к развитию таких патологических состояний, как инфаркты, инсульты, тромбоемболии, кровотечения, осложнения послеоперационного периода. Раннее выявление клинически значимых полиморфизмов в генах, обуславливающих предрасположенность к тромбогенным заболеваниям, позволяет осуществлять профилактику и диагностику заболевания еще до развития клинической картины, а также подбирать персонализированную схему лечения и определять риск развития осложнений, связанных с применением лекарственных препаратов. В представленной работе разработан набор “SNP2-TMG”, предназначенный для выявления 10 генетических маркеров предрасположенности к тромбогенным заболеваниям (rs1801131, rs6025, rs11549465, rs429358, rs7412, rs1799963, rs6050, rs1799762, rs2010963, rs1801133) методом минисеквенирования с использованием технологии SNaPshot. Этот набор прошел клинические испытания и разрешен к использованию как изделие медицинского назначения.

Ключевые слова: тромбогенные заболевания, генетический полиморфизм, SNP, минисеквенирование, SNaPshot

DOI: 10.31857/S0026898425020031, **EDN:** GGTFSD

ВВЕДЕНИЕ

Многие заболевания сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем организма являются многофакторными и полигенными, возникающими в результате совместного вклада как факторов окружающей среды, так и множества независимо действующих или взаимодействующих генов, причем вклад каждого из этих факторов в отдельности может быть несущественным или никак не проявляться. Раннее выявление клинически значимых полиморфизмов (наиболее часто это однонуклеотидные замены, SNP) в генах, обуславливающих предрасположенность к тому или иному заболеванию, позволяет проводить профилактические мероприятия и своевременную диагностику еще до развития клинической картины, предупреждая тяжелые последствия заболевания [1].

Сердечно-сосудистые заболевания, развитие которых связано в том числе с воздействием факторов тромбогенного риска (нарушение системы свертываемости крови и тромбофилия), являются главной причиной смерти в мире [2]. Тромбогенные факторы могут быть как временными, так и постоянными. К временным факторам относятся прием лекарственных препаратов (например, оральных контрацептивов), патология плода и репродуктивные потери, хирургические вмешательства, химиотерапия и др., тогда как постоянные факторы – это нарушения в генах системы свертывания крови и фибринолиза, а также в генах компонентов систем липидного обмена.

Сотрудниками Института генетики и цитологии НАН Беларуси проведено комплексное исследование (в рамках мероприятия 9 “Разработка и изготовление опытных образцов наборов реагентов для выявления генетических марке-

Сокращения: SNP – однонуклеотидная замена, однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism).

ров риска развития широко распространенных заболеваний” научно-технической программы Союзного государства “ДНК-идентификация”) генетических факторов риска нарушений в системе свертывания крови и фолатном цикле, определены 10 генетических маркеров, используемых при выявлении риска развития тромботических заболеваний [3].

Генетические варианты **rs7412** и **rs429358** гена *APOE*, локализованного на хромосоме 19 в одном кластере с генами аполипопротеинов C1 и C2. Ген *APOE* кодирует белок-переносчик липопротеинов [4], входящий в состав хиломикрон — липопротеинов, образующихся в тонком кишечнике в процессе всасывания экзогенных липидов. Обнаружены варианты нуклеотидной последовательности этого гена, приводящие к развитию семейной дисбеталипопротеинемии или третьему типу гиперлипопротеинемии, при которых увеличение содержания холестерина и триглицеридов в плазме обусловлено невыведением остатков хиломикрона и липопротеинов очень низкой плотности (VLDL) [4, 5].

Генетический вариант **rs6025** гена *F5*. Ген *F5* кодирует фактор V свертываемости крови — синтезируемый в печени гликопротеин, который присутствует в плазме крови и α-гранулах тромбоцитов и активируется при отщеплении активационного пептида тромбином в ходе коагуляции. Активированный белок V является кофактором, который вместе с активированным фактором X участвует в превращении протромбина в тромбин. Повреждения гена *F5* приводят к аутомному рецессивному геморрагическому диатезу или аутомной доминантной форме тромбофилии [6].

Генетический вариант **rs11549465** гена *HIF1A* ассоциирован с сердечно-сосудистыми и ишемическими заболеваниями. Ген *HIF1A* кодирует альфа-субъединицу фактора 1, индуцируемого гипоксией (HIF-1). HIF-1 является основным регулятором как клеточного, так и системного ответа на гипоксию, он активирует транскрипцию множества генов, которые участвуют в энергетическом метаболизме, ангиогенезе, апоптозе, а также генов, белковые продукты которых вовлечены в адаптацию к гипоксии. HIF-1 также играет важную роль в васкуляризации эмбриона, ангиогенезе опухолей и в патофизиологии ишемической болезни [7]. Идентифицированы альтернативные варианты сплайсинга мРНК гена *HIF-1*.

Генетические варианты **rs1801131** и **rs1801133** гена *MTHFR*. Этот ген кодирует метилентетрагидрофолатредуктазу, которая катализирует превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, косубстрат ремети-

лирования гомоцистеина в метионин. Генетические варианты гена *MTHFR* влияют на предрасположенность к окклюзивным сосудистым заболеваниям (закупорка сосудов), повреждению нервных волокон, раку толстой кишки и острому лейкозу. Мутации в гене *MTHFR* приводят к снижению активности метилентетрагидрофолатредуктазы [8, 9].

Генетический вариант **rs6050** гена *FGA* [10], кодирующего альфа-субъединицу фибриногена, который входит в состав кровяного сгустка. При травме сосуда синтезированный пробелок подвергается протеолизу тромбином, что приводит к превращению фибриногена в фибрин. Мутации в гене *FGA* считаются причиной ряда заболеваний, включая дисфибриногемию, гипофибриногемию, афибриногемию и почечный амилоидоз. В результате альтернативного сплайсинга образуются многочисленные изоформы, как минимум одна из которых может подвергаться протеолитическому процессингу.

Генетический вариант **rs1799963** гена *F2*, кодирующего фактор свертывания крови 2, или протромбин II. Этот фактор протеолитически расщепляется с образованием тромбина на первом этапе коагуляционного каскада. F2 также участвует в обеспечении целостности сосудов в ходе внутриутробного и постнатального развития. С-концевые пептиды протромбина II обладают антимикробной активностью в отношении *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Мутации *F2* связаны с различными формами тромбозов и диспротромбонемией [6]. Альтернативный сплайсинг первичного транскрипта *F2* приводит к образованию разных изоформ мРНК гена *F2*.

Генетический вариант **rs1799762** гена *SERPINE1*, кодирующего эндотелиальный ингибитор 1 активатора плазминогена (PAI-1), который входит в суперсемейство ингибиторов сериновых протеиназ и инактивирует тканевый PA и урокиназу, нарушая механизм фибринолиза. Повреждения гена *SERPINE1* приводят к дефициту PAI-1, а высокие концентрации продукта этого гена связаны с тромбофилией [11].

Генетический вариант **rs2010963** гена *VEGF*, кодирующего фактор роста эндотелия сосудов, входящий в семейство PDGF/VEGF. Фактор VEGF — это гепаринсвязывающий гомодимерный белок. VEGF индуцирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток сосудов, он важен как для физиологического, так и патологического ангиогенеза. Повреждения гена *VEGF* приводят к аномальному образованию сосудов у эмбрионов мышей. Ген *VEGF* активирован в большинстве известных типов опухолевых клеток, а его экспрессия коррелирует со стадией и прогрессией опухоли [12]. Аллельные

варианты гена *VEGF* ассоциированы с микрососудистыми осложнениями при сахарном диабете типа 1 и атеросклерозе.

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) выявляют с использованием ряда молекулярно-биологических методов, таких как анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, аллель-специфичная ПЦР [13, 14], ПЦР в режиме реального времени, гибридизация на ДНК-чипах, минисеквенирование с последующим масс-спектрометрическим анализом и различные виды секвенирования ДНК [15, 16].

В основе разработанного набора “SNP2-TMG” лежит технология SNaPshot фирмы “Applied Biosystems” (США), основанная на реакции минисеквенирования с последующим разделением фрагментов ДНК методом капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции [17–19].

Принцип работы метода SNaPshot основан на гибридизации олигонуклеотидных праймеров непосредственно перед целевым SNP и удлинении этого праймера дидезоксинуклеотидом (ddNTP). Таким образом к праймеру добавляется только одно основание, комплементарное положению целевого SNP. Связавшийся ddNTP распознается с использованием специфических флуоресцентных красителей, связанных с каждым из четырех ddNTP. Продукты разделяются автоматическим секвенатором, который регистрирует электрофоретическую подвижность фрагмента и длину волны его флуоресцентного сигнала. Этот метод позволяет проводить мультиплексную реакцию, используя одновременно несколько праймеров разной длины [19].

Процесс SNaPshot начинается с обогащения участков генома, несущих целевые SNP, методом ПЦР с праймерами, фланкирующими целевой сайт, с последующей ферментативной очисткой продуктов ПЦР от несвязавшихся праймеров (экзонуклеаза I) и остатка dNTP (щелочная фосфатаза, rSAP). Далее в ходе реакции минисеквенирования очищенные продукты ПЦР амплифицируют в присутствии флуоресцентно-меченных ddNTP с праймером, 3'-конец которого непосредственно граничит с искомой SNP, а 5'-конец может быть модифицирован некомплементарной последовательностью, необходимой для достижения желаемой длины праймера. Полученные ПЦР-продукты очищают от неиспользованных флуоресцентно-меченных ddNTP (rSAP), а затем анализируют методом капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе [18].

Согласно протоколу производителя, система SNaPshot позволяет в ходе одной реакции

проанализировать вплоть до 10 SNP вне зависимости от их расположения на хромосоме и от расстояния между соседними SNP-локусами [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/cms_101014.pdf]. Однако опубликованы данные о создании на основе этой технологии более многочисленных мультиплексов [16]. Эта технология характеризуется высокой производительностью и крайне высокой чувствительностью (возможность детектировать 5% минорного аллеля в образце). Минисеквенирование широко используется в судебной экспертизе, популяционной и медицинской генетике, генотипировании микроорганизмов [19–25]. Эта технология не требует использования меченых олигонуклеотидных праймеров, что значительно упрощает мультиплексирование. Огромным преимуществом метода является автоматический анализ данных с помощью специального модуля в программном обеспечении GeneMapper® Software. Из недостатков стоит выделить необходимость в высокой квалификации персонала и приобретение специфических реактивов.

Нами разработан набор реагентов “SNP2-TMG”, предназначенный для выявления 10 генетических маркеров предрасположенности к тромбогенным заболеваниям методом минисеквенирования SNaPshot. Перечень определяемых однонуклеотидных замен приведен в табл. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК человека выделяли из образцов слюны с помощью набора реактивов “ДНК-ВК”, ТУ ВУ 100185129.154-2021 (ИБОХ, Республика Беларусь). Концентрацию ДНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США). Контрольная ДНК индивидов с известными генотипами по исследуемым полиморфизмам предоставлена Институтом генетики и цитологии НАН Беларуси.

Подбор олигонуклеотидных праймеров для амплификации участков ДНК, содержащих анализируемые SNP. Олигонуклеотидные праймеры конструировали с использованием программы Vector NTI из пакета Invitrogen/Vector NTI Advance 10. Наличие в нуклеотидных последовательностях сайтов неспецифической гомологии с выбранными праймерами проверяли с использованием поисковой системы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, NCBI, США). Праймеры подбирали с учетом их использования в мультиплексной реакции таким образом, чтобы длина ампликона составляла 150–300 п.н., длина праймера – 20–25 нуклеотидов, GC-состав праймера 40–60%, температура плавления праймера 55–65°C; проверяли

Таблица 1. Генетические маркеры риска развития тромбогенных заболеваний, определяемые набором “SNP2-TMG”

№ п/п	Генетический вариант	Ген/Полиморфизм
1	rs7412	<i>APOE</i> Cys112Arg
2	rs429358	<i>APOE</i> Arg158Cys
3	rs11549465	<i>HIF1A</i> C1772T
4	rs6050	<i>FGA</i> Thr312Ala
5	rs1799963	<i>FII</i> G20210A
6	rs6025	<i>FV</i> Arg506Gln
7	rs2010963	<i>VEGF</i> G634C
8	rs1801131	<i>MTHFR</i> A1298C
9	rs1801133	<i>MTHFR</i> C677T
10	rs1799762	<i>SERPINE1</i> 4G/5G

также отсутствие вторичных структур с энергией разрыва (ΔG) меньше -3.0 ккал/моль. Праймеры, подобранные к каждому маркеру, попарно сравнивали с праймерами к другим маркерам на вероятность образования праймер-димеров. Праймеры синтезированы научно-производ-

ственной компанией “Синтол” (РФ) и “Праймтех” (Беларусь). Характеристики олигонуклеотидных праймеров приведены в табл. 2.

Подбор олигонуклеотидных праймеров для минисеквенирования. Праймер для минисекве-

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры для амплификации участков ДНК, содержащих анализируемый SNP, и их характеристики

Генетический вариант, SNP	Олигонуклеотиды, фланкирующие область ДНК, содержащую генетический вариант	$T_{пл}$, °C	Длина ампликона, п.н.
rs6025	RS6025F GCCCATATTTAGCCAGGAGACC	59.9	194
	RS6025R CAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATC	60.0	
rs6050	RS6050F CCAGAGCCTGGGCTATCTGGCC	62.8	261
	RS6050R GACTGGAGGGACTGCAACCTGG	59.4	
rs7412	RS429358F GCGGGCACGGCTGTCCAAGG	66.3	305
	RS7412R GCACGCGGCCCTGTTCCACC	66.2	
rs1799762	RS1799762F CACGTTGGTCTCCTGTTTCCTTACC	58.9	216
	RS1799762R GGTCTTCCCTCATCCCTGCC	58.4	
rs1799963	RS1799963F GGCTCCTGGAACCAATCCCG	60.1	199
	RS1799963R TGCTCGGACTACCAGCGTGC	58.5	
rs1801131	RS1801131F GGGCACAGGATGGGGAAGTCAC	61.2	211
	RS1801131R CCAAGGAGGAGCTGCTGAAGATG	59.0	
rs1801133	Rs1801133F CAAAGCGGAAGAATGTGTCAGCC	59.6	199
	Rs1801133R GGTCTCTTCATCCCTCGCCTTG	58.7	
rs2010963	RS2010963F TTGCTTGCCATTCCTCACTTG	59.4	216
	RS2010963R CCCCCAAAAGCAGGTCACCTCAC	59.3	
rs11549465	RS11549465F GCTCCCTATATCCCAATGGATGATGAC	60.7	217
	RS11549465R TGTCTTCATACGGTCTTTTGTCACTG	59.4	

нирования (SNaPshot-праймер) каждого анализируемого SNP-маркера подбирали таким образом, чтобы следующий присоединяемый ddNTP детектировал однонуклеотидную замену. SNaPshot-праймеры, чтобы их можно было мультиплексировать, должны отличаться по длине, поэтому их синтезировали в диапазоне длин от 20 до 100 нуклеотидов. Праймеры подбирали таким образом, чтобы длины получаемых фрагментов отличались минимум на 4 нуклеотида. Длина специфической части праймера составляла 15–30 нуклеотидов. Проверяли образование шпильчатых структур, гомо- и гетеродимеров специфическими последовательностями праймеров. Желаемую длину праймеров обеспечивали, достраивая 5'-конец праймера частью нейтральной последовательности 5'-(gact)_n-3', которая является случайной и не соответствует ни одной последовательности генома человека, аннотированной в базе данных NCBI. Анализировали также возможность отжига праймеров как на смысловую, так и на антисмысловую цепь ДНК. Сконструированные праймеры (табл. 3) использовали при постановке одиночных и мультиплексных реакций минисеквенирования для каждого из определяемых маркеров.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР проводили в амплификаторе T100 (“Bio-Rad”, США). Использовали 10-кратную смесь для амплификации собственного производства, содержащую 600 мМ Трис-НСI (рН 9.0), 170 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Твин20, 15 мМ MgCl₂, 2 мМ смесь dNTP. В работе использовали Q5 High-

Fidelity DNA Polymerase (“NEB”, США). В качестве энхансера использовали раствор для улучшения ПЦР “AMPLIBEST SOLUTION” (ИБОХ НАН Беларуси). Программа амплификации: 95°C, 5 мин; затем 30 циклов – 95°C, 30 с; 68°C, 30 с; 72°C, 30 с; 72°C, 5 мин.

Минисеквенирование. Продукты ПЦР для очистки от неиспользованных олигонуклеотидных праймеров и dNTP обрабатывали нуклеазой ExoI (“NEB”) и фосфатазой rSAP (“NEB”) (10 и 1 ед. акт., соответственно, на 5 мкл реакционной смеси после амплификации). Смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин с последующей инактивацией при 75°C в течение 15 мин.

Для проведения реакции минисеквенирования использовали набор SNaPshot Multiplex Kit (“Thermo Fisher”, США). После проведения SNaPshot-реакции смесь обрабатывали 1 ед. акт. фосфатазы rSAP (“NEB”) при 37°C в течение 60 мин с последующей инактивацией (75°C, 15 мин). Для анализа продуктов минисеквенирования в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 9.25 мкл Hi-Di формамида, 0.25 мкл размерного стандарта GeneScan LIZ120 Size Std Kit (“Applied Biosystems”, США), 0.5 мкл продукта минисеквенирования. Проводили тепловую денатурацию – 95°C, 5 мин – с последующим охлаждением до 10°C.

Продукты минисеквенирования анализировали на генетическом анализаторе Hitachi ABI3500 (полимер POP4 (“Thermo Fisher”),

Таблица 3. SNaPshot-праймеры для реакции минисеквенирования

Генетический вариант, SNP	5'-Добавочный неспецифичный участок SNaPshot-праймера	Специфичный участок SNaP-shot-праймера*	Возможный ddNTP**
rs7412	gact	CTGGTACACTGCCAGGC	22G, 22A
rs429358	gact	GCGGACATGGAGGACGTG	23T, 23C
rs6050	gactgact	GGTTTTGGTTTCCAGTACTTCCAG	33T, 33C (33A)
rs11549465	aactgactaaact	GCTTGCGGAAGTCTTTCTAATG	37G, 37A
rs6025	aactgactaaact	CTTCAAGGACAAAATACCTGTATTCCT	41C, 41T
rs1799963	aactgactaaactagg	GCACTGGGAGCATTGAGGCT	37C, 37T
rs2010963	gactgact	GCGTGCGAGCAGCGAAAG	27C, 27G
rs1801131	aactgactaaactaggtgccacg	GGGAGGAGCTGACCAGTGAAG	45A, 45G (45T, 45C)
rs1801133	aactgactaaactaggtgccacgtcgtg	GGAGAAGGTGTCTGCGGGAG	49C, 49T
rs1799762	aactgactaaactaggtgccacgtcgtgaaagt	CTCCgATgATACACggCTgACTCCCC	60A, 60C

*Часть олигонуклеотидного праймера, комплементарная последовательности геномной ДНК.

**Каждый из четырех ddNTP в SNaPshot-реакции имеет собственную флуоресцентную метку, поэтому возможный нуклеотид для наглядности выделен цветом, соответствующим цвету пика на электрофореграмме.

длина капилляров 36 см) с обработкой результатов при помощи программного обеспечения “GeneMapper® 4.0” (“Thermo Scientific”).

Секвенирование по Сэнгеру. Для валидации результатов генотипирования, полученных с использованием минисеквенирования, проводили секвенирование по Сэнгеру отдельных ампликонов, содержащих интересующий SNP. Для этого проводили амплификацию с выбранными образцами ДНК (выборка включала весь набор известных генотипов 10 маркеров) в условиях, приведенных выше для ПЦР, разделяли продукты амплификации в агарозном геле с последующей очисткой с использованием набора “Nucleospin Gel and PCR Clean-up” (“Macherey-Nagel”, Германия). Очищенные продукты амплифицировали с прямым или обратным праймером с использованием набора для секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”), а затем очищали набором Applied Biosystems BigDye X Terminator Purification Kit. Секвенирование проводили на приборе Hitachi 3130 Genetic Analyzer (полимер POP7, капилляр 36 см).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мультиплексная амплификация целевых участков ДНК человека, содержащих анализируемый SNP

Первой стадией минисеквенирования методом SNaPshot является реакция амплификации (ПЦР) для обогащения участков генома, несущих целевые SNP, с праймерами, фланкирующими целевой сайт.

Исходя из того что для создания набора наиболее удобно использовать мультиплексирование ПЦР-реакций в одной пробирке, сначала оптимизировали синглплексные ПЦР-реакции для каждого маркера отдельно. С этой целью использовали подход, включающий оптимизацию по двум параметрам: использованию ПЦР-энхансера и температуре отжига олигонуклеотидных праймеров (50–70°C).

Затем маркеры со сходными условиями амплификации объединили в два мультиплекса. Состав реакционной смеси для мультиплексных ПЦР оптимизировали по количеству олигонуклеотидных праймеров, поскольку в мультиплексных системах некоторые мишени амплифицируются лучше, нежели другие: *Мультиплекс 1* предполагает амплификацию в одной пробирке фрагментов ДНК, содержащих **rs7412** (концентрация праймеров 0.8 мкМ), **rs429358** (концентрация праймеров 0.8 мкМ), **rs6025** (концентрация праймеров 0.4 мкМ), **rs11549465** (концентрация праймеров 0.8 мкМ), **rs1801131** (концентрация прайме-

ров 0.4 мкМ), в следующих условиях: использование ПЦР-энхансера, температура отжига 68°C; *Мультиплекс 2* предполагает амплификацию в одной пробирке фрагментов ДНК, содержащих **rs6050** (концентрация праймеров 0.4 мкМ), **rs1799963** (концентрация праймеров 0.6 мкМ), **rs1799762** (концентрация праймеров 0.4 мкМ), **rs2010963** (концентрация праймеров 0.4 мкМ), **rs1801133** (концентрация праймеров 0.4 мкМ), в следующих условиях: без ПЦР-энхансера, температура отжига 68°C.

Для проверки наработкой необходимых фрагментов ДНК в мультиплексных ПЦР 1 и 2 проводили ПЦР с каждой парой праймеров по отдельности, а в качестве матрицы использовали ПЦР-продукт после мультиплексной ПЦР, а не геномную ДНК. На рис. 1 и 2 показаны результаты электрофоретического разделения ПЦР-продуктов амплификации всех фрагментов мультиплекса 1 и мультиплекса 2 по отдельности, в качестве матрицы для амплификации которых использовали смесь ПЦР-продуктов после постановки мультиплексной ПЦР 1 (рис. 1) и 2 (рис. 2).

Также протестировано влияние исходного количества ДНК на эффективность мультиплексной амплификации (рис. 3).

Из рис. 3 видно, что обе мультиплексные реакции эффективно проходят даже при очень низкой концентрации ДНК в реакционной смеси. Чувствительность разработанных мультиплексных систем не менее 1 нг геномной ДНК.

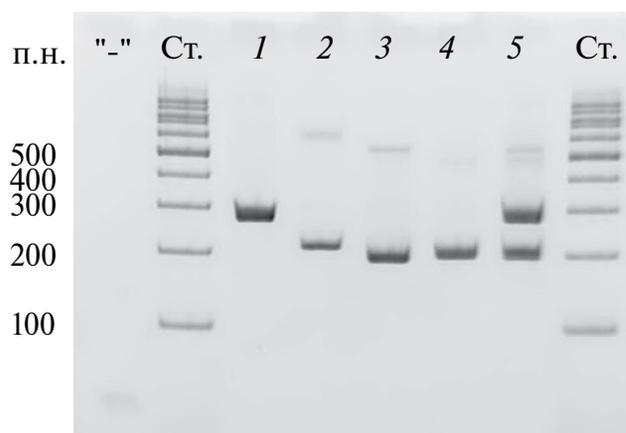


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации отдельных маркеров и мультиплексной реакции *Мультиплекса 1* набора “SNP2-TMG” в 10%-ном полиакриламидном геле. “-” – отрицательный контроль; 1 – **rs7412** + **rs429358**; 2 – **rs11549465**; 3 – **rs6025**; 4 – **rs1801131**; 5 – мультиплексная реакция 1; Ст. – стандарт длин ДНК-фрагментов 100–1000 п.н. (№ SM0241, “Thermo Scientific”).

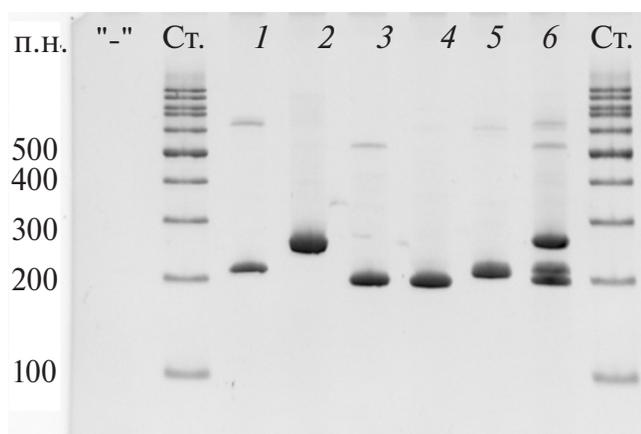


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации отдельных маркеров и мультиплексной реакции *Мультиплекса 2* набора “SNP2-TMG” в 10%-ном полиакриламидном геле. “-” – отрицательный контроль; 1 – rs2010963; 2 – rs6050; 3 – rs1799963; 4 – rs1801133; 5 – rs1799762; 6 – мультиплексная реакция 2. Ст. – стандарт длин ДНК-фрагментов 100–1000 п.н. (№ SM0241, “Thermo Scientific”).

В результате получены две стабильно работающие мультиплексные ПЦР-системы, позволяющие с одинаковой эффективностью наращивать ПЦР-фрагменты, содержащие 10 маркеров предрасположенности к тромбозным заболеваниям, и пригодные для дальнейшего анализа методом минисеквенирования.

Минисеквенирование

Как и в случае ПЦР-амплификации целевых фрагментов ДНК, содержащих интересующие SNP, при постановке реакции минисеквенирования предполагалось мультиплексирование SNaPshot праймеров в одной пробирке. В силу структурных особенностей последовательностей, содержащих эти SNP, первоначальную амплификацию разделили на два мультиплекса по пять мишеней в каждом, поэтому SNaPshot-праймеры также были разнесены на два мультиплекса, набор праймеров в которых соответствовал SNP в продуктах амплификации мультиплексов 1 и 2: *Plex SSHOT1* (rs1801131, rs6025, rs11549465, rs429358, rs7412), *Plex SSHOT2* (rs1799963, rs6050, rs1799762, rs2010963, rs1801133).

Для проверки работоспособности каждого отдельного SNaPshot-праймера проводили отдельную SNaPshot-реакцию с использованием ПЦР-продукта, содержащего известный(е) генотип(ы) каждого из исследуемых SNP. Параллельно для валидации генотипа продукты ПЦР для каждого известного генотипа по каждому SNP разделяли в агарозном геле, очища-

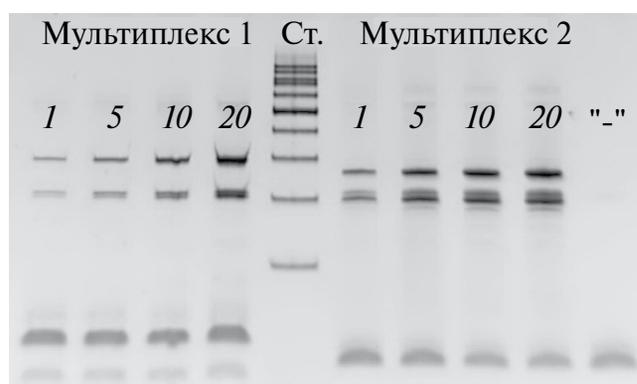


Рис. 3. Мультиплексная ПЦР 1 и 2 с различными исходными концентрациями (1–20 нг) ДНК человека в реакционной смеси. “-” – отрицательный контроль, Ст. – стандарт длин ДНК-фрагментов 100–1000 п.н. (№ SM0241, “Thermo Scientific”).

ли и подвергали секвенированию по Сэнгеру. Маркер считали валидированным при совпадении результатов секвенирования и минисеквенирования методом SNaPshot. Сравнение электрофореграмм секвенирования и минисеквенирования каждого маркера приведены на рис. S1–S10 (Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2025/2/supp_Grudo_rus.pdf).

В результате проведенных мультиплексных SNaPshot-реакций созданы *маркерные панели* для идентификации аллелей в соответствии с протоколами “Руководства пользователя” для ДНК-секвенатора (капилляры длиной 36 см, POP-4-полимер и внутренний размерный стандарт “GS120LIZ”) с использованием опции “Panel manager” программы GeneMapper® 4 (табл. 4).

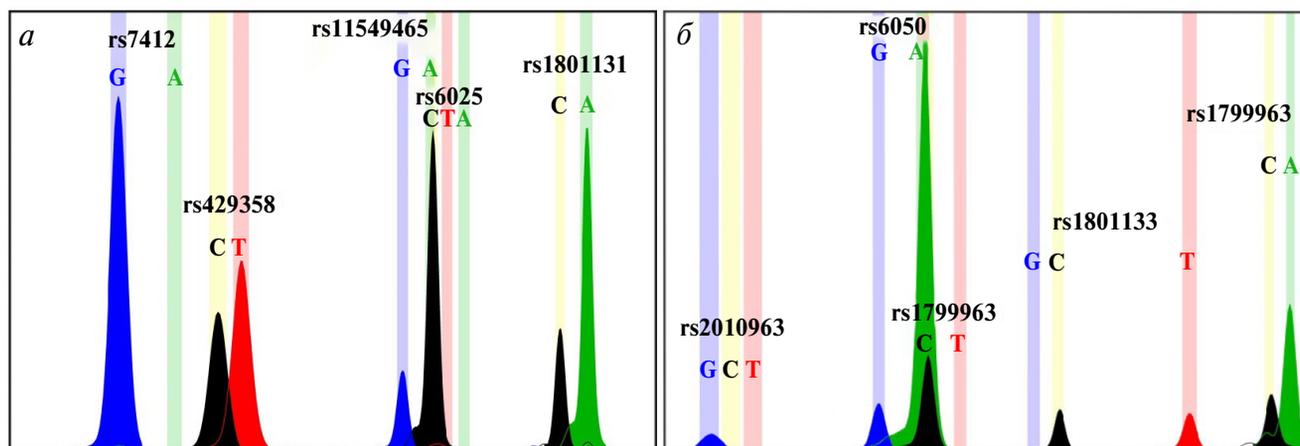
Разработанный набор “SNP2-TMG” апробирован на 100 образцах геномной ДНК человека с различными генотипами. Использовали образцы ДНК индивидов с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями, образцы ДНК с известными генотипами по исследуемым SNP, верифицированными другими методами, а также ДНК здоровых доноров.

На рис. 4 приведен результат мультиплексного минисеквенирования произвольного образца ДНК с помощью *Plex SSHOT1* (rs1801131, rs6025, rs11549465, rs429358, rs7412), *Plex SSHOT2* (rs1799963, rs6050, rs1799762, rs2010963, rs1801133).

В некоторых случаях диапазоны бинов частично перекрываются: в *Plex SSHOT1* – rs6025 (C) и rs11549465 (A); в *Plex SSHOT2* – rs1799963 (C) и rs6050 (A). Однако это не мешает интерпретации данных, так как цвета анализируемых

Таблица 4. Параметры маркерных панелей *Plex SSHOT1* и *Plex SSHOT2*

Маркер	Диапазон длин фрагмента, нуклеотиды			
	A	G	C	T
<i>Plex SSHOT1</i>				
rs1801131	49.25–49.85	–	48.1–48.5	–
rs6025	43.6–44.1	–	42.2–42.6	42.8–43.3
rs11549465	41.95–42.35	40.75–41.25	–	–
rs429358	–	–	32.0–32.8	33.2–33.95
rs7412	29.9–30.6	27.3–28.0	–	–
<i>Plex SSHOT2</i>				
rs1799963	–	–	41.15–41.6	42.0–42.55
rs6050	40.55–41.1	38.75–39.25	–	–
rs1799762	–	–	57.1–57.45	57.65–58.2
rs2010963	–	30.15–30.95	31.7–32.5	33.0–33.8
rs1801133	–	46.0–46.55	47.45–47.95	52.85–53.45

**Рис. 4.** Результат мультиплексного минисеквенирования произвольного образца ДНК с помощью *Plex SSHOT1* (а) и *Plex SSHOT2* (б). Цветными столбцами обозначены бины каждого возможного нуклеотида.

пиков не перекрываются между собой в данных позициях. Кроме того, наблюдается несбалансированность по количеству нарабатываемых продуктов. В мишени **rs6050** при выявлении генотипа GA при оптимальной визуализации основания G происходит зашкаливание пика основания A. В случае мишени **rs2010963** оптимизация условий и компонентов реакционной смеси не привела к пропорциональному увеличению интенсивности пика G. Высота целевых пиков должна составлять не менее 50 ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) и при анализе намного превышает данный показатель. Стоит обратить внимание, что интенсивность пиков может варьировать от образца к образцу, однако не может быть ниже порогового значения.

Результатом апробации набора на большой выборке ДНК человека (100 образцов), выделенной из различных источников (кровь, слюна, буккальный эпителий) с различной концентрацией (диапазон концентраций 5–30 нг/мкл), стало 100%-ное определение в каждом образце всех 10 генетических маркеров, входящих в набор “SNP2-TMG”, что делает данный набор точным инструментом генетического тестирования предрасположенности к тромбогенным заболеваниям. Набор “SNP2-TMG” успешно прошел клинические испытания, получено заключение о возможности его применения в клинической практике при проведении молекулярно-диагностических исследований. Совместно с Институтом генетики и цитологии НАН Беларуси разработана форма интерпретации результатов

генетического тестирования предрасположенности к развитию тромбогенных заболеваний, приведенная в Дополнительных материалах (см. электронное приложение).

Выявление генетических вариантов в анализируемых генах имеет важное прогностическое и терапевтическое значение. Обнаружение этих генетических вариантов у клинически здоровых пациентов позволит диагностировать предрасположенность к тромбогенным заболеваниям и предупредить их тяжелые последствия. Подтверждение генетической природы заболевания у больного позволит более точно выбрать схему лечения.

Таким образом, разработан набор “SNP2-TMG”, позволяющий с использованием метода минисеквенирования и технологии SNaPshot с высокой точностью и чувствительностью определять одновременно 10 генетических маркеров предрасположенности к тромбогенным заболеваниям в геномной ДНК человека. Набор зарегистрирован как изделие медицинского назначения и может использоваться в медицинской лабораторной практике. Разработанный нами набор, несмотря на длительность анализа (8 ч) в сравнении, например с ПЦР-РВ (1–2 ч), обладает целым рядом преимуществ, среди которых стоит особенно выделить одновременное определение 10 генетических маркеров и 100%-ную точность определения SNP, схожую с точностью секвенирования по Сэнгеру.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института генетики и цитологии НАН Беларуси Моссе И.Б., Амеляновичу М.Д. за предоставление перечня генетических маркеров риска развития тромбогенных заболеваний и контрольных образцов ДНК с известными генотипами.

Работа выполнена в рамках мероприятия 9 “Разработка и изготовление опытных образцов наборов реагентов для выявления генетических маркеров риска развития широко распространенных заболеваний” научно-технической программы Союзного государства “Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства” (“ДНК-идентификация”) на 2017–2021 годы.

Исследование проведено с соблюдением всех необходимых этических норм, а также одобрено комитетом по этике БелМАПО от 04.12.2017 Протокол № 4.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khera A.V., Chaffin M., Aragam K.G., Haas M.E., Roselli C., Choi S.H., Natarajan P., Lander E.S., Lubitz S.A., Ellinor P.T., Kathiresan S. (2018) Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat. Genet.* **50**(9), 1219–1224.
2. Toms T.E., Smith J.P., Panoulas V.F., Blackmore H., Douglas K.M.J., Kitis G.D. (2012) Apolipoprotein E gene polymorphisms are strong predictors of inflammation and dyslipidemia in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **39**(2), 218–225.
3. Моссе И.Б., Гончар А.Л., Кундас Л.А., Седляр Н.Г., Булгак А.Г., Зотова О.В., Королева Т.С. (2021) Молекулярно-генетические факторы предрасположенности к развитию фибрилляции предсердий у представителей белорусской популяции. *Кардиология в Беларуси.* **13**(4), 500–511.
4. Chang M., Yesupriya A., Ned R.M., Mueller P.W., Dowling N.F. (2010) Genetic variants associated with fasting blood lipids in the U.S. population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *BMC Med. Genet.* **20**, 11–62.
5. Klarin D., Emdin C.A., Natarajan P., Conrad M.F., INVENT Consortium; Kathiresan S. (2017) Genetic analysis of venous thromboembolism in UK biobank identifies the ZFPM2 locus and implicates obesity as a causal risk factor. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **10**(2), e001643.
6. Nagy G., Kovacs-Nagy R., Kereszturi E., Somogyi A., Szekely A., Nemeth N., Hosszufalusi N., Panczel P., Ronai Z., Sasvari-Szekely M. (2009) Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. *BMC Med. Genet.* **10**, 79.
7. Kaiser R., Li Y., Chang M., Catanese J., Begovich A.B., Brown E.E., Edberg J.C., McGwin G.Jr., Alarcón G.S., Ramsey-Goldman R., Reveille J.D., Vilá L.M., Petri M.A., Kimberly R.P., Taylor K.E., Criswell L.A. (2012) Genetic risk factors for thrombosis in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **39**(8), 1603–1610.
8. Norambuena P.A., Copeland J.A., Krenková P., Stamborgová A., Macek M.Jr. (2009) Diagnostic method validation: high resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the *MTHFR* gene. *Clin. Biochem.* **42**(12), 1308–1316.
9. Li J.F., Lin Y., Yang Y.H., Gan H.L., Liang Y., Liu J., Yang S.Q., Zhang W.J., Cui N., Zhao L., Zhai Z.G., Wang J., Wang C. (2013) Fibrinogen α Thr312A-la polymorphism specifically contributes to chronic thromboembolic pulmonary hypertension by increasing fibrin resistance. *PLoS One.* **8**(7), e69635.
10. Su S., Chen S., Zhao J., Huang J., Wang X., Chen R., Gu D. (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 gene: selection of tagging single nucleotide polymorphisms and association with coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**(4), 948–954.
11. Prieto-Peña D., Remuzgo-Martínez S., Genre F., Oejo-Vinyals J.G., Atienza-Mateo B., Muñoz-

- Jimenez A., Ortiz-Sanjuán F., Romero-Yuste S., Moriano C., Galíndez-Agirregoikoa E., Calvo I., Ortego-Centeno N., Álvarez-Rivas N., Miranda-Fillooy J.A., Llorente I., Blanco R., Gualillo O., Martín J., Márquez A., Castañeda S., Ferraz-Amaro I., López-Mejías R., González-Gay M.A. (2022) Vascular endothelial growth factor haplotypes are associated with severe ischaemic complications in giant cell arteritis regardless of the disease phenotype. *Clin. Exp. Rheumatol.* **40**(4), 727–733.
12. Motawea M.M., Zaki M.E.S., Saif M., Osman A.O.B., Nada A.M. (1985) Study of single nucleotide polymorphism of vascular endothelium factor in patients with differentiated thyroid cancer. *Clin. Diabetes Endocrinol.* **8**(1), 9.
13. Myers R.M., Lumelsky N., Lerman L.S., Maniatis T. (1985) Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature.* **313**(6002), 495–498.
14. Hayashi K. (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* **1**(1), 34–38.
15. Marsh S., King C.R., Garsa A.A., McLeod H.L. (2005) Pyrosequencing of clinically relevant polymorphisms. *Methods Mol. Biol.* **311**, 97–114.
16. Sobrino B., Brión M., Carracedo A. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci. Int.* **154**(2–3), 181–194.
17. Geppert M., Roewer L. (2012) SNaPshot(R) minisequencing analysis of multiple ancestry-informative Y-SNPs using capillary electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **830**, 127–140.
18. Fondevila M., Børsting C., Phillips C., de la Puente M., Euroforen-NoE Consortium, Carracedo A., Morling N., Lareu M.V. (2017) Forensic SNP genotyping with SNaPshot: technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays. *Forensic Sci. Rev.* **29**(1), 57–76.
19. Mehta B., Runa D., Phillips C., McNevin D. (2017) Forensically relevant SNaPshot assays for human DNA SNP analysis: a review. *Int. J. Legal Med.* **131**(1), 21–37.
20. Palencia-Madrid L., Vinueza-Espinosa D., Baeta M., Rocandio A.M., de Pancorbo M.M. (2020) Validation of a 52-mtSNP minisequencing panel for haplogroup classification of forensic DNA samples. *Int. J. Legal Med.* **134**(3), 929–936.
21. Tupikowska-Marzec M., Kolačkov K., Zdrojowy-Wełna A., Słoka N.K., Szepietowski J.C., Maj J. (2019) The influence of *FTO* polymorphism rs9939609 on obesity, some clinical features, and disturbance of carbohydrate metabolism in patients with psoriasis. *Biomed. Res. Int.* **13**, 1–5.
22. Wang J., Wang X., Ma Z., Yun K., Liu J., Chen D., Liu Z., Shi J., Li Z., Gao C., Du Q., Zhang G. (2018) A SNaPshot assay for detection of 45 mutations in the *SCN5A* gene in the Chinese Han population. *Electrophoresis.* **39**(17), 2270–2276.
23. Carano F., Sarno S., De Fanti S., Serventi P., Bini C., Luiselli D., Pelotti S. (2018) Genetic variability of *CYP2D6*, *CYP2B6*, *CYP2C9* and *CYP2C19* genes across the Italian Peninsula. *Ann. Hum. Biol.* **45**(1), 66–71.
24. Ferri G., Pelotti S. (2009) Multiplex ABO genotyping by minisequencing. *Methods Mol. Biol.* **496**, 51–58.
25. Alvarez-Iglesias V., Barros F., Carracedo A., Salas A. (2008) Minisequencing mitochondrial DNA pathogenic mutations. *BMC Med. Genet.* **10**, 9–26.
26. Bouakaze C., Keyser C., de Martino S.J., Sougkoff W., Veziris N., Dabernat H., Ludes B. (2010) Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex species by use of a SNaPshot minisequencing-based assay. *J. Clin. Microbiol.* **48**(5), 1758–1766.

Identification of Genetic Markers of Predisposition to Thrombogenic Diseases by Minisequencing Analysis: Reagent Set “SNP2-TMG”

© 2025 A. V. Grudo*, I. V. Haidukevich, G. V. Sergeev

*State scientific institution “Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, 220084 Republic of Belarus*

**e-mail: vasilevskaya.av@gmail.com*

Thrombogenic risk factors (blood coagulation disorders and thrombophilia) are the cause of cardiovascular diseases, among which genetic factors are worth highlighting (genetic polymorphism of the blood coagulation system, angiogenesis factors, components of the lipid metabolism system). Early identification of clinically significant polymorphisms in genes that cause predisposition to thrombogenic diseases allows for preventive measures and timely diagnosis even before the onset of the clinical picture of the disease, and for patients with an already confirmed diagnosis genetic diagnostics makes it possible to check the hereditary nature of the disease, select treatment tactics, predict the risk of developing of adverse drug reactions. This article describes the process of developing the “SNP2-TMG” kit, designed to identify ten genetic markers of susceptibility to thrombogenic diseases (rs1801131, rs6025, rs11549465, rs429358, rs7412, rs1799963, rs6050, rs1799762, rs2010963, rs1801133), by minisequencing technique (SNaPshot technology). This kit has passed clinical trials and is approved for medical use.

Keywords: thrombogenic diseases, gene polymorphism, SNP, minisequencing technique, SNaPshot