

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **24150**

(13) **С1**

(46) **2023.12.30**

(51) МПК

C 12Q 1/6886 (2018.01)

(54) **НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ hMSH2
В ОБРАЗЦЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ЧЕЛОВЕКА**

(21) Номер заявки: а 20210332

(22) 2021.11.29

(43) 2023.06.30

(71) Заявители: Горчакова Ольга Владимировна; Кузнецов Олег Евгеньевич (ВУ)

(72) Авторы: Горчакова Ольга Владимировна; Кузнецов Олег Евгеньевич (ВУ)

(73) Патентообладатели: Горчакова Ольга Владимировна; Кузнецов Олег Евгеньевич (ВУ)

(56) CN 106520965 A, 2017.

PL 192152 B1, 2006.

RU 2688189 C1, 2019.

APESSOS A. et al. hMSH2 is the most commonly mutated MMR gene in a cohort of Greek HNPCC patients. British Journal of Cancer, 2005, v. 92, p. 396-404.

(57)

Набор для определения мутаций в гене hMSH2 в образце биологического материала человека методом ПЦР, включающий Taq ДНК полимеразу в концентрации 5 ед/мкл, 10X ТБЕ буфер, MgCl₂ в концентрации 3,25 мМ, dNTP в концентрации 10 мМ, воду для молекулярно-биологических исследований, свободную от ДНКаз и РНКаз, ДНК-маркер GeneRulerDNA Ladders 50bp и праймеры, имеющие следующий нуклеотидный состав:

GTCGCGCATTTTCTTCAACC	MSH2- ex 1-f
GCTGCTCACCGCCCACTCT	MSH2- ex 1-r
TTGAACATGTAATATCTCAAATCTGT	MSH2- ex 2-f
AAAGGAAGATAATTACSTTATATGC	MSH2- ex 2-r
TCAAGAGTTTGTAAATTTTAAAA	MSH2- ex 3-f
CTAGGCCTGGAATCTCCTCT	MSH2- ex 3-r
TTCCSTTTTCTCATAGTAGTTTAA	MSH2- ex 4-f
TTGTAATTCACATTTATAATCCATG	MSH2- ex 4-r
CCAGATGGTATAGAAATCTTCG	MSH2- ex 5-f
CCATTC AACATTTTAAACCTT	MSH2- ex 5-r
GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT	MSH2- ex 6-f
GCAGGTACATAAAACSTAAACGAAAG	MSH2- ex 6-r
CATTAATTC AAGTTAATTTATTTCA	MSH2- ex 7-f
AAAACA AAATCACTTGTTACSTTCA	MSH2- ex 7-r
TGAGATCTTTTATTTGTTTGT	MSH2- ex 8-f
TTTGCTTTTAAAAATAACTACTGC	MSH2- ex 8-r
GGATTTTGTCACTTTGTCTGT	MSH2- ex 9-f
TCCAACSTCCAATGACCCAT	MSH2- ex 9-r
TGGAATACTTTTCTTTTCTTCT	MSH2- ex 10-f
GCATTTAGGGAATTAATAAAGGG	MSH2- ex 10-r

ВУ 24150 С1 2023.12.30

BY 24150 C1 2023.12.30

ATAAACTGTTATTTTCGATTTGCA	MSH2- ex 11-f
CCAGGTGACATTCAGAACATT	MSH2- ex 11-r
TTATTATTCAGTATTCCTGTGTACA	MSH2- ex 12-f
CCCACAAAGCCCCAAAACC	MSH2- ex 12-r
ATAATTTGTTTTGTAGGCCCC	MSH2- ex 13-f
TTTCTATCTTCAAGGGACTAGGAG	MSH2- ex 13-r
CCACATTTTATGTGATGGGAA	MSH2- ex 14-f
CCAATAGTACATACCTTTCTTCACC	MSH2- ex 14-r
GTCCCCTCACGCTTCCC	MSH2- ex 15-f
AAACSTATGAAAACAACTGACAAAC	MSH2- ex 15-r
AATGGGACATTCACATGTGTT	MSH2- ex 16-f
CCATGGGCACTGACAGTTAA	MSH2- ex 16-r.

Изобретение относится к медицине и биологии, а именно к молекулярной биологии и онкологии, касается определения мутаций в гене hMSH2 и может быть использовано для обнаружения различий в уровне экспрессии ДНК гена hMSH2 в нормальных и опухолевых клетках/тканях.

Большинство злокачественных опухолей, как правило, возникает в результате превращения нормально функционирующих клеток в злокачественные [1]. Канцерогенез характеризуется фенотипически различными стадиями. Этот ступенчатый процесс сопровождается активацией транскрипции ряда онкогенов, а также уменьшением или полной потерей транскрипционной активности так называемых генов-супрессоров опухолевого роста [2]. Это изменение может быть определено с помощью обратной транскрипции с последующей стандартной полимеразной цепной реакцией (стандартный, полуколичественный метод ОТ-ПЦР) или полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) - способ количественной оценки активности генов, определяемой по количеству мРНК, транскрибируемой с ДНК этих генов на клетку опухоли.

Для идентификации молекулярных биомаркеров опухоли выявляют гены, чья экспрессия (синтез ДНК) сильно различается в норме и злокачественных опухолях. К отобранным генам получают олигонуклеотиды - праймеры, позволяющие избирательно измерять активность данного гена в синтезе мРНК. Из исследуемого образца выделяют мРНК и синтезируют на ее основе кДНК [4, 5].

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является набор для обнаружения мутации Q61R в белке NRAS в образце опухолевой ткани человека, при применении которого используют способ, включающий получение образца биологического материала, взятого у пациента, выделение ДНК из указанного образца и проведение ПЦР с использованием набора для обнаружения мутации Q61R в белке NRAS (прямой праймер: 5'-CCACACCCCCAGGATTCTTAC-3' (SEQ ID NO: 3), обратный праймер: 5'-CGCCTGTCCTCATGTATTGG-3' (SEQ ID NO: 4). При обнаружении сигнала в указанной реакции ПЦР от красителя, связанного с олигонуклеотидом SEQ ID NO: 1, констатируют присутствие мутации Q61R в белке NRAS в образце указанного пациента, а при обнаружении сигнала от красителя, связанного с олигонуклеотидом SEQ ID NO: 2, констатируют отсутствие мутации Q61R в белке NRAS в образце указанного пациента [3].

Описанное техническое решение использует в своей основе готовые коммерческие тест-системы и недостаточно удовлетворяет требованиям качества детектируемых дефектов гена, а именно: при проведении исследования амплификация и последующая детекция искомого фрагмента гена определена конкретным диапазоном детекции, что не позволяет избирательно и точно утверждать о значимости выявленных нарушений. Контроль исследований осуществляется по принципу необнаружения продуктов амплификации искомого фрагмента гена без контрольной подтверждающей детекции методом прямого секвениро-

BY 24150 C1 2023.12.30

вания генома. Кроме того, способ применим только для образцов тканей предположительно опухолевой природы. В разных биологических образцах (жидкостях, тканях) клетки несут различные физико-химические, в частности тинкториальные, характеристики, которые следует учитывать при выполнении молекулярно-биологического исследования и последующей детекции полученных результатов. При данном способе выполнения исследования до 40-50 % вынесенных в результате анализа заключений несут противоречивые суждения и требуют повторного анализа.

Задача изобретения - разработка набора для определения мутаций в онкогене hMSH2, включающего последовательности нуклеотидных оснований (праймеры), позволяющего при проведении исследования выбрать те, которые специфически гибридизируются с кДНК, которая образует с амплифицируемой ДНК устойчивое соединение, и, в сравнении со стандартом молекулярного веса, констатировать мутацию в искомом экзоне гена hMSH2. Набор применим для образцов тканей опухолевой и неопухолевой природы.

Поставленная задача решается и технический результат достигается путем получения образца биологического материала у пациента, выделения ДНК из указанного образца и проведения ПЦР-анализа с использованием заявляемого набора праймеров для обнаружения мутации в гене, при этом отличием является то, что при выполнении ПЦР из праймеров, специфические транскрипты которых расположены в 1-16 экзонах гена hMSH2, выбирают праймеры, которые специфически гибридизируются с кДНК в присутствии интеркалирующего красителя при электрофоретической детекции, который образует с амплифицируемой ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в виде светящихся оранжево-красных полос в геле, и, если в сравнении со стандартом молекулярного веса в полученных результатах обнаруживают продукты амплификации ПЦР-реакции, констатируют мутацию в искомом экзоне гена hMSH2, если детектируемый фрагмент образца не имеет продукта амплификации и/или не соответствует стандартному молекулярному весу - отсутствие мутации в гене hMSH2 в образце указанного пациента.

Изобретение осуществляют следующим образом.

Используют заявляемый набор для определения мутаций в гене hMSH2 в образце биологического материала человека, включающий компоненты ПЦР-смеси: Таq ДНК полимеразу 5 ед/мкл, 10X ТБЕ буфер, 3,25 mM MgCl₂, 10mM dNTP, воду для молекулярно-биологических исследований, свободную от ДНКаз и РНКаз, ДНК-маркер GeneRuler-DNaLadders50bp и последовательности нуклеотидных оснований - праймеры:

GTCCGCGCATTTTCTTCAACC	MSH2- ex 1-f
GCTGCTCACCGCCCACTCT	MSH2- ex 1-r
TTGAACATGTAATATCTCAAATCTGT	MSH2- ex 2-f
AAAGGAAGATAATTACSTTATATGC	MSH2- ex 2-r
TCAAGAGTTTGTTAAATTTTAAAA	MSH2- ex 3-f
CTAGGCCTGGAATCTCCTCT	MSH2- ex 3-r
TTCSTTTTCTCATAGTAGTTTAAA	MSH2- ex 4-f
TTGTAATTCACATTTATAATCCATG	MSH2- ex 4-r
CCAGATGGTATAGAAATCTTCG	MSH2- ex 5-f
CCATTC AACATTTTAAACCSTT	MSH2- ex 5-r
GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT	MSH2- ex 6-f
GCAGGTTACATAAACTAACGAAAG	MSH2- ex 6-r
CATTAATTC AAGTTAATTTATTTCA	MSH2- ex 7-f
AAAACAAAATCACTTGTTACSTTCA	MSH2- ex 7-r
TGAGATCTTTTTATTTGTTTGTTTT	MSH2- ex 8-f
TTTGCTTTTTTAAAAATAACTACTGC	MSH2- ex 8-r
GGATTTTGTCACTTTGTTCTGTT	MSH2- ex 9-f
TCCAACCTCCAATGACCCAT	MSH2- ex 9-r
TGGAATACTTTTTCTTTCTTCTT	MSH2- ex 10-f

BY 24150 C1 2023.12.30

GCATTTAGGGAATTAATAAAGGG	MSH2- ex 10-r
ATAAAACTGTTATTTTCGATTTGCA	MSH2- ex 11-f
CCAGGTGACATTCAGAACATT	MSH2- ex 11-r
TTATTATTCAGTATTCCTGTGTACA	MSH2- ex 12-f
CCCACAAAGCCCAAAAACC	MSH2- ex 12-r
ATAATTTGTTTTGTAGGCCCC	MSH2- ex 13-f
TTTCTATCTTCAAGGGACTAGGAG	MSH2- ex 13-r
CCACATTTTATGTGATGGGAA	MSH2- ex 14-f
ССААТАGТАСАТАССТТТСТТТАСС	MSH2- ex 14-r
GTCCCCTCACGCTTCCC	MSH2- ex 15-f
AAACTATGAAAACAAACTGACAAAC	MSH2- ex 15-r
AATGGGACATTCACATGTGTT	MSH2- ex 16-f
CCATGGGCACTGACAGTTAA	MSH2- ex 16-r.

При определении мутаций в гене hMSH2 с использованием набора реагентов в соответствии с формулой изобретения получают образец биологического материала от пациента; выделяют ДНК из указанного образца; проводят ПЦР-анализ при помощи ПЦР-смеси и подобранных последовательностей нуклеотидных оснований - праймеров, охарактеризованных в формуле изобретения, специфические транскрипты которых расположены в 1-16 экзонах гена hMSH2, гибридизируются с кДНК в присутствии интеркалирующего красителя при электрофоретической детекции и образуют с амплифицируемой ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в виде светящихся оранжево-красных полос в геле; если, относительно стандартного молекулярного веса GeneRulerDNA Ladders 50bp, в полученных результатах детектируют продукты амплификации ПЦР-реакции, то констатируют мутацию в искомом экзоне гена hMSH2 исследуемого образца пациента, если детектируемый фрагмент образца не имеет продукта амплификации и/или не соответствует молекулярному весу GeneRulerDNA Ladders 50bp - констатируют отсутствие мутации в гене hMSH2 исследуемого образца пациента.

Для проведения анализа используют биоптатный материал нормальной и пораженной опухолью ткани, полученный при оперативных вмешательствах, образцы сыворотки и/или плазмы крови (метод выделения геномной ДНК из образцов ткани, а также сыворотки/плазмы крови пациентов выполним стандартными методами с использованием коммерчески доступных наборов реагентов). Выполняют стандартный, полуколичественный ПЦР-анализ, в котором амплифицируемый фрагмент экзона детектируют методом гелеэлектрофореза.

Молекулярно-генетическое исследование образцов ДНК на наличие мутаций в гене hMSH2 проводят методом ПЦР-анализа: амплификация ДНК выполнена по протоколу в автоматическом режиме на амплификаторе с применением подобранных последовательностей нуклеотидных оснований - праймеров, специфические транскрипты которых расположены в 1-16 экзонах исследуемого гена.

Подбор праймеров осуществляется таким образом, чтобы они специфически гибридизовались с кДНК, которая образует с амплифицируемой ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в виде светящихся полос в геле (УФ-излучение, длина волны 230-300 нм). Для подбора праймеров и температур отжига реакции используют коммерчески доступные программы: Oligo, версия 6.42; PrimerSelect из пакета Lasergene; Primer5, Primers3, EasyExonPrimer (Wu X., Munroe D.J. EasyExonPrimer: Automated Primer Design for Exon Sequences. Appl Biomformatics, 2006, 5, 119-120), ExPrimer (Sandhu K.S., Acharya K.K. ExPrimer: to design primers from exon-exon junctions. Bioinformatics, 2005, 21, 2091-2092), PerlPrimer, FastPCR (www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs./fastpcr.htm), PrimerQuest (www.scitools.idtdna.com/Primerquest). Длина праймеров выбрана в диапазоне 12-28 пар нуклеотидов (п. н.).

Изобретение поясняется примерами 1-3, подтверждающими возможность его осуществления и использования.

Пример 1.

Технология постановки реакции ПЦР (обнаружение мутации гена hMSH2):

тестируемая ДНК - 2 мкл;

ПЦР-смесь (для 1 реакции):

1. Taq DNA полимеразы 5 ед/мкл - 0,5 мкл.
2. 10X ТБЕ буфер - 2,5 мкл.
3. 25мМ MgCl₂ - 1,5 мкл.
4. 10мМ dNTP - 0,25 мкл.
5. Вода для молекулярно-биологических исследований, свободная от ДНКаз и РНКаз - 14,69 мкл.
6. Маркеры ДНК для электрофореза GeneRulerDNA Ladders 50bp.
7. Подобранные праймеры (охарактеризованные в формуле изобретения): «прямой» - 1,0 мкл, «обратный» - 1,0 мкл.

Приготовление рабочего реагента: к 2 мкл тестируемой ДНК добавляют 23 мкл ПЦР-смеси. Программирование термоциклера и проведение амплификации осуществляется по следующему протоколу: 94 °С - 10 мин; 10 циклов - 94 °С 25 с, 67 °С 25 с, 72 °С 35 с; 35 циклов - 55 °С 40 с, 72 °С 40 с. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации производят в 2 % агарозном геле: 12,5 мкл продукта, 100 В - 40 мин, сила тока 120-140 мА, фрагменты ДНК видимы в ультрафиолетовом свете при длине волны 230-300 нм.

Результат исследования учитывается относительно известного молекулярного веса стандартных фрагментов ДНК: маркер ДНК GeneRulerDNA Ladders 50bp, Fermentas, Литва (пар оснований: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50).

Результат исследования учитывается относительно известного молекулярного веса стандартных фрагментов ДНК (маркер ДНК): если в сравнении со стандартом молекулярного веса в полученных результатах обнаруживают продукты амплификации ПЦР-реакции, констатируют мутацию в искомом экзоне гена hMSH2. Образец является отрицательным (без мутации), если детектируемый фрагмент образца не имеет продукта амплификации и/или не соответствует искомому молекулярному весу (п. о.).

Для доказательства возможности выявления мутаций в онкогене hMSH2 проведены молекулярно-генетические исследования биологического материала (образцы тканей опухоли природы, сыворотки/плазмы). В ходе проведения реакции выделения ДНК получено достаточное количество генетического материала для проведения исследования с молекулярным весом, достаточным для проведения реакций по определению мутаций в гене hMSH2.

Специфичность подобранных праймеров сравнивали с нормальной последовательностью ДНК гена hMSH2 и с имеющимися мутациями с использованием международной базы данных генома BLAST Assembled Genomes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>) - праймер (последовательность, прямой «F», обратный «R») - размер фрагмента, пар нуклеотидов (п. н.).

В результате проведенного исследования разработанным набором для определения мутаций в гене hMSH2 установлено, что на основании подобранных праймеров выявляются мутации гена hMSH2 и возможно получение достаточного количества искомой ДНК.

Пример 2.

Анализ генетических изменений (мутаций) гена hMSH2 (городской житель, женщина, русская, 54 года, С. 20. - рак верхнеампулярного отдела прямой кишки, ст. II T3N2M1 / метастазы в печени IV ст.; у матери - рак прямой кишки, у тети - рак прямой кишки, у бабушки - рак ректосигмоидного соединения) позволил установить наличие генетических изменений в искомой последовательности гена hMSH2: экзон 17 (R659X - мутация с.1975 C > T), экзон 8 (R219X - мутация G655A).

BY 24150 C1 2023.12.30

Результаты подтверждения обнаруженных в соответствии с заявляемым изобретением изменений ДНК подтверждены методом прямого секвенирования ДНК гена hMSH2 (8-й и 17-й экзон): обнаружена мутация экзона 17 гена hMSH2 (мутация впервые описана в 1996 г.: встречается в популяциях Финляндии, Великобритании, США и Индии, имеет клиническое значение) и выявлена замена оснований экзона 17 (R659X - мутация с.1975 C > T), экзона 8 (R219X - мутация G655A).

Таким образом, проведенный молекулярно-генетический анализ позволил установить наличие мутации в гене hMSH2.

Пример 3.

Набор сравнения. Анализ генетических изменений (мутаций) гена hMSH2, выполненный коммерческой диагностической тест-системой Qiagen, Голландия (набор реагентов PyroMark Q24 CpG hMSH2, ПЦР-комплект, ген hMSH2), не обнаружил мутаций экзона 17 (R659X - мутация с.1975 C > T) гена hMSH2 и не выявил замены оснований экзона 8 (R219X - мутация G655A).

Полученные результаты удовлетворяют требованиям качества: выделена ДНК, детектированы изменения гена hMSH2, выполнен поиск и детекция мутаций, проведено контрольное исследование методом прямого секвенирования, оценен молекулярный вес детектируемых фрагментов гена.

Диагностическая чувствительность и диагностическая эффективность способа определения мутации методом ПЦР с использованием предложенного набора компонентов ПЦР-смеси и последовательностей нуклеотидных оснований-праймеров для его осуществления составила 99,9 %. Себестоимость одного исследования гена hMSH2 (по 16 экзонам) при использовании предлагаемого набора по отношению к себестоимости метода прямого секвенирования (Applied Biosystems, США) составила 37,1 у. е. против 119,3 у. е. в пользу предлагаемого решения (1 у. е. - 2,0 бел. руб.).

Таким образом, использование предлагаемого набора для определения мутаций в гене hMSH2 на основе подобранных последовательностей нуклеотидных оснований (праймеров) дает возможность получить достаточное количество ДНК, детектировать экзоны гена hMSH2 и выполнить поиск и детекцию мутаций искомым фрагментов.

Источники информации:

1. LYNCH H.T. and de la C.A. Hereditary colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 2003, vol. 348, p. 919-932.
2. KASHIDA H. et al. Early colorectal cancer: concept, diagnosis, and management. Int. J. Oncol. 2006, 11, 1-8.
3. RU 2688189, 2019.
4. FUKUMOTO S. et al. Overexpression of the aldoketo reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' nonsmall cell lung carcinomas. Clin. Cancer Res. 11, 1776-1785; Penning T.M. 2005. AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. Clin. Cancer. Res. 11, 1687-1690.
5. МАШКОВА Т.Д. и др. Транскрипция генов TIMP3, DAPK1 и AKR1B10 при плоскоклеточном раке легкого. Мол. биол., 2006, 40, 1027-1054.