

РАЗРАБОТКА IN-HOUSE ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СТРУКТУРНОГО ПОЛИМОРФИЗМА И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНА АЛЬФА-1 ЦЕПИ КОЛЛАГЕНА 1 (COL1A1), УЧАСТВУЮЩЕГО В РЕГУЛЯЦИИ КОСТНОГО ГОМЕОСТАЗА

Полюян О. С., Костюк С. А., Мельникова Т. Ю., Юдина Н. А.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Хронический периодонтит определяется как разрушение опорных тканей зубов и резорбция альвеолярной кости, возникающее в том числе в результате генетически детерминированных процессов. Основная роль в формировании периодонтита принадлежит гену, кодирующему белковую цепь альфа-1 коллагена 1. Определенные полиморфизмы в этом гене связаны с повышением продукции этой цепи, что приводит к нарушению соотношения между белковыми цепями в составе коллагена 1. Продукция коллагена с нарушенной структурой является одним из факторов, повышающих вероятность разрушения соединительной и костной тканей.

Ключевые слова: альфа-1 цепь коллагена 1, полиморфизм, уровень нормализованной экспрессии, праймеры, программа амплификации.

Введение. Болезни периодонта — ведущая стоматологическая проблема. Наибольшей распространенности (60–65 %) периодонтит достигает у людей старше 30 лет. Одной из задач лечения пациентов с заболеваниями периодонта становится профилактика или устранение функциональной перегрузки периодонта, которая на определенной стадии болезни оказывается одним из главных патогенетических факторов, определяющих ее течение [1].

Распространенность изменений минеральной плотности зубов и периодонта составляет 80 %, а у людей старше 40 лет выявляются в 100 % случаев. Встречаемость патологии твердых тканей зубов и периодонта увеличивается с возрастом. Существенный прирост данной патологии отмечен у женщин в пре- и постменопаузальном периоде. После 45 лет частота заболеваний периодонта у женщин составляет 58,7 % по сравнению с 26,6 % в возрасте 20–30 лет. Исследованиями стоматологов и остеологов определена роль гипоэстрогемии у женщин в постменопаузальном периоде

в развитии системного остеопороза и патологических процессов в зубочелюстной системе [2].

За последнее десятилетие появилось много работ, предполагающих возможную корреляцию между системным остеопорозом и убылью костной ткани альвеолярного отростка при патологии пародонта. Точный механизм взаимосвязи остеопорозных изменений костей скелета с течением заболеваний периодонта пока неизвестен. Чаще всего выдвигается гипотеза, трактующая пониженную плотность костной ткани альвеолярного отростка как фактор, предрасполагающий к повышенной резорбции, вызванной периодонтопатогенной флорой. Однако в данном случае стоит говорить о регионарных проявлениях остеопороза, поскольку воспалительные процессы в периодонте захватывают в большей степени альвеолярный отросток, не затрагивая тела челюстей. В то же время в этиологии остеопороза и периодонтита имеется много сходных патогенетических моментов, что наводит на мысль о взаимосвязи этих двух заболеваний. Например, оба они ха-

рактируются убылью костной ткани, сходными факторами риска (курение, прием лекарственных препаратов, убыль костной ткани, связанная с возрастом, а самое главное — чрезмерные уровни множества воспалительных цитокинов и лизосомальных ферментов, ответственных за местное разрушение тканей) [3].

Остеопороз относится к широко распространенным метаболическим заболеваниям скелета. В структуре заболеваемости по социально-экономической и медицинской значимости остеопороз стал ведущей патологией костно-мышечной системы. Наиболее распространенной формой заболевания является постменопаузальный остеопороз, которым страдают до 40 % женщин в постменопаузе. Причем в большинстве случаев остеопороз длительное время остается нераспознанным и выявляется только лишь после возникновения низкоэнергетических переломов [4].

Учитывая актуальность остеопороза, мультифакторную природу и ведущую роль генетических факторов в его развитии, чрезвычайно важным является поиск генетических предикторов заболевания [5].

Коллаген 1-го типа является основным белком матрикса соединительной (до 25–30 %) и костной (90 %) тканей. Он придает механическую прочность и выполняет морфогенетическую функцию, влияя на рост, миграцию и дифференцировку клеток, определяя их секреторную и синтетическую активность. Структурно он образован из α -1- и α -2-полипептидных цепей, синтез которых у человека детерминируется двумя соответствующими генами — *COL1A1* и *COL1A2*. В настоящее время известны мутации в этих генах, приводящие к развитию переломов, остеопений, а также полиморфизмы, ассоциированные со снижением минеральной плотности костной ткани [6].

К настоящему времени выделена группа генов-кандидатов остеопороза, к перечню которых отнесен и ген α -1 цепи коллагена 1-го типа (*COL1A1*). Мутации в генах, участвующих в образовании коллагена, могут быть причиной структурно-функциональных изменений основного компонента соединительной ткани и способствовать развитию ряда заболеваний, в том числе остеопороза. Одной из таких мутаций является полиморфизм Sp1 в гене *COL1A1* (rs1800012), который приводит к увеличению соотношения α -1 и α -2-цепей коллагена и в конечном итоге к ухудшению костной микроархитектуры [6].

Ген α -1-цепи коллагена 1-го типа (*COL1A1*) расположен на 17 хромосоме в области q21.3–22.

В первом интроне гена *COL1A1* существует сайт узнавания для транскрипционного фактора Sp1, в котором обнаружена замена гуанина на тимин (1546G>T; af017178), приводящего к возникновению Col1A1*s аллеля, функциональная активность которого составляет не более 16 % по сравнению с Col1A1*S аллелем [6].

Влияние полиморфизма Sp1 гена *COL1A1*, а также уровней экспрессии данного гена на минеральную плотность костной ткани изучалось и ранее. Однако имеющиеся данные свидетельствуют о противоречивости полученных результатов. Кроме того, проводимые ранее немногочисленные исследования по определению роли структурного и функционального состояния гена альфа-1 цепи коллагена 1 в развитии нарушений минеральной плотности тканей не позволяют в достаточной мере раскрыть накопившиеся вопросы и сделать достаточно обоснованные выводы.

Цель работы — разработка молекулярно-генетического метода выявления полиморфизма Sp1 (1546G>T) и определения уровней нормализованной экспрессии гена *COL1A1*, участвующего в регуляции костного гомеостаза.

Материалы и методы. В качестве биологического материала для выявления структурных особенностей и функционального состояния гена, участвующего в регуляции костного гомеостаза, использовали содержимое перидонтального кармана 79 пациентов с заболеваниями периодонта, проходивших амбулаторное лечение на базе кафедры общей стоматологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», а также 15 практически здоровых женщин, составивших группу контроля.

Для выполнения молекулярно-генетических исследований по выявлению полиморфизма Sp1 гена *COL1A1* выделение ДНК из биологического материала проводили с использованием сорбции ДНК на поверхности мембраны специальной колонки (набор реагентов «АртДНК MiniSpin» («АртБиоТех», Беларусь).

Для разработки метода определения уровней нормализованной экспрессии гена *COL1A1* использовали метод выделения РНК, основанный на принципе связывания нуклеиновых кислот с силикатными сорбентами в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевого буфера (набор реагентов «АртРНК MiniSpin» («АртБиоТех», Беларусь).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметриче-

ское распределение и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 25/75 процентилей: Me (Q25/75). Для относительных показателей определяли 95%-й доверительный интервал (95% ДИ). Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна — Уитни (U-тест). Критическим принят уровень значимости $p < 0,05$ [7].

Результаты и их обсуждение. *Разработка метода выявления полиморфизма Sp1 гена COL1A1.* В качестве мишени для дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров с помощью демонстрационной версии коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 и встроенного приложения AlignX выбран интрон 1 гена альфа-1 цепи коллагена 1 COL1A1 (рисунок).

Для выявления нуклеотидной замены гуанина (G) на тимин (T) в положении 1546 (G1546T) с использованием бесплатного программного онлайн приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн алгоритма mfold/DNAfold нами были подобраны олигонуклеотидные специфические праймеры (таблица 1).

Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров и осуществлен анализ последовательности предполагаемого ампликона C-01_1: AACCACATCGAGCTTTGAGTTCTGCTTCTGCAAGCTCTGCCTGTGGGGAATCCTGCCTCCTTGAGCCTTATGCG.

Анализ наличия вероятных гомо и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров проводили с использованием встроенного алгоритма Vector NTI — Oligo Duplexes. Условия проведения анализа: +60 °C (таблица 2).

```

481 acggccaaga ggaaggccaa gtcgagggcc aagacgaaga cagtaagtcc caaacttttg
541 ggagtgcaag gatactctat atcgcgcctt gcgcttggtc ccgggggccc cggcttaaaa
601 cgagacgtgg atgatccgga gactcgggaa tggaaaggag atgatgaggg ctcttcctcg
661 gcgcccctgag acaggagggg gctcaccctg gggcgaggtt ggggttgaac gcgccccggg
721 agcgggaggt gagggtggag cgccccgtga gttggtgcaa gagagaatcc cgagagcgca
781 accgggggag tgggatcag ggtgcagagt gaggaaagta cgtcgaagat gggatggggg
841 cgccgagcgg ggcatttgaa gccaagatg tagaagcaat caggaaggcc gtgggatgat
901 tcataaggaa agattgcctt ctctgcccgc tagagtgtt ctgggcccgtg ggggtgctgg
961 gcagccgcgg gaagggggtg cggagcgtgg gcgggtggag gatgagaaac tttggcgagg
1021 actcggcggg ggggggtcct tgcgccccct cctgaccgat gctgagcact gcgtctccc
1081 gtccaacgct tactggggca ggagccggag cgggaagacc cgggttattg ctgggtgagg
1141 acccccacct ctgatctgg aaagtaaagc cagggatggg gcagcccaag cctcttaaa
1201 aggtagtcgg gccggtgagg tcggccccgc cccggcccca ttgcttagcg ttgcccgaca
1261 cctagtggcc gtctggggag ccgctagcgc ggtgggagtg gttagctaac ttctggacta
1321 tttgcggact tttggttct ttggctaaaa gtgacctgga ggcattggct ggctttgggg
1381 gactggggat ggccccgaga gcgggctttt aagatgtcta ggtgctggag gttagggtgt
1441 ctcttaattt tgaggtaac ttcaagtctt gggggggcgt ccttccaat cagccgctc
1501 cattctctta gccccgccc cgccacccca catgcccagg gaatggggg gggatgaggg
1561 atggacctcc cttctctct cctcgcctt cctcctgtct ctaccacgca agccactccc
1621 cacgagcctg ccctcccgat gggggccctc ctattctccc cccgcccctc ccctctcacc
1681 ctgtggtttt atttcaactg gcttcagcgc caatgggctg aggttgaggt tggaaagccac
1741 cgcgactaa agctttgttt aaattcctga gaactggaaa gagttacagc ctccctggcc
1801 aggcgcctcg gcgctgtcac ccgctgat gaggagcagg cgagctttta aggatttgag
1861 gaaagaagaa cggggggagg ggcgggaagt gaaaaatcca agtgtgcctc ttagaccggg
1921 gggaaaggtg gtaagctgg gggttgcagt cactactgac aacgcccctc ttccgctgt
1981 cccagtccca ccaatcacct gcgtacagaa cggcctcagg taccatgacc gagacgtgtg
    
```

Рисунок — Фрагмент интрона 1 гена альфа-1 цепи коллагена 1 COL1A1

Таблица 1 — Последовательности выбранных специфических олигонуклеотидных праймеров

Вариант	Олигонуклеотид	Последовательность	Мод. 5'	Мод. 3'
C-01_1	C-01_1_F	GTCCAGCCCTCATCCTGGCC	Нет	Нет
	C-01_1_R	TAACTTCTGGACTATTTGCGGACTTTTTGG	Нет	Нет
C-01_2	C-01_2_F	CCAATCAGCCGCTCCCATTC	Нет	Нет
	C-01_2_R	CATCGGGAGGGCAGGCTC	Нет	Нет

Примечания — Мод. 5' — модификация дезокси-нуклеотида на 5'-конце олигонуклеотида; Мод. 3' — модификация дезокси-нуклеотида на 3'-конце олигонуклеотида.

Таблица 2 — Результаты анализа термодинамических характеристик вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров и зондов варианта С-01_1

Олигонуклеотид	Стабильные/ всего	ΔG , kcal/mol
Вероятные гомодимеры		
С-01_1_F / С-01_1_F	0/0	—
С-01_1_R / С-01_1_R	1/3	—
Вероятные гетеродимеры		
С-01_1_F / С-01_1_R	0/3	—

Примечание — ΔG — свободная энергия Гиббса.

Результат анализа показал, что в условиях проведения ПЦР вероятно образование стабильного гомодимера обратного праймера. Около 25 % всех молекул обратного праймера во время этапа отжига/элонгации будут находиться в неэффективном, димеризованном состоянии и не будут участвовать в реакции. Это может быть компенсировано повышением конечной концентрации обратного праймера.

Анализ вероятности образования вторичных шпильчатых структур для ампликона ограничиваемого альтернативным набором олигонуклеотидных праймеров и зонда (TCCTCATTTGCCGCTTTGAGTTCATGATTGCTCTTGCAAGCTCTGCCTGTGGGGAATCCTGCTGAACCAAGCCTTCGACG — С-01_2) также для последовательности С-01 (288 п.о.) показал наличие схожих конструкций.

В силу практически полной идентичности ампликонов С-01_1 и С-01_2 согласно алгоритмам mfold во время протекания ПЦР в режиме реального времени все вероятные вторичные шпильчатые структуры будут нестабильны.

Дальнейший анализ предполагаемого ампликона с использованием встроенного алгоритма Vector NTI показал наличие 22 (против 18 в случае С-01_1) вероятных вторичных шпильчатых структур, однако в модельных условиях все они характеризовались низкой стабильностью и, как следствие, низкой вероятностью образования. Тем не менее анализ вероятности образования стабильных гомодимеров ампликона показал наличие 1 стабильной структуры из 40 возможных.

Анализ наличия вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров (алгоритм Vector NTI) показал их отсутствие (таблица 3).

Анализ показал отсутствие стабильных гомо- и гетеродимеров прямого и обратного праймеров. В отличие от набора С-01_2 в слу-

чае С-01_1 присутствует 1 гомодимер обратного праймера, что повышает число активных олигонуклеотидов в реакционной смеси и позволяет выбрать набор С-01_2 для последующей работы.

Таблица 3 — Результаты анализа термодинамических характеристик вероятных гомо- и гетеродимеров альтернативного набора олигонуклеотидных праймеров С-01_2

Олигонуклеотид	Стабильные/ всего	ΔG , kcal/mol
Вероятные гомодимеры		
С-01_2_F / С-01_2_F	0/0	—
С-01_2_R / С-01_2_R	0/2	—
Вероятные гетеродимеры		
С-01_2_F / С-01_2_R	0/2	—

Проведена оценка специфичности выбранных наборов олигонуклеотидных праймеров и зондов с использованием онлайн приложения NCBI/Blast, в результате которой установлена 100%-я гомология геному человека и отсутствие гомологии с другими организмами.

Оптимизация ПЦР проводилась за несколько последовательных этапов. На первом этапе формировалось понятие «стандартные условия проведения ПЦР», т. е. выбирался стартовый состав реакционной смеси, включая концентрации олигонуклеотидных праймеров, концентрацию дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, концентрацию двухвалентных ионов (ионы магния), количество единиц активности термостабильной полимеразы и др. при необходимости. Также исходя из ожидаемых размеров ампликона(ов) и смоделированных температур отжига олигонуклеотидов выбирался режим термоциклирования.

На следующем этапе готовились смеси специфических олигонуклеотидов и проводилась реакция в стандартных условиях. В зависимости от результатов этого этапа корректировался состав реакционной смеси и/или программа термоциклирования.

В ходе оптимизации состава амплификационной смеси были протестированы различные объемы внесения выделенной ДНК (от 1 до 5 мкл в концентрации от 10 до 100 мкг/мкл), праймеров (от 0,2 до 1,0 мкл каждого), Taq полимеразы (от 0,1 до 1,0 мкл в концентрации от 1 до 5 Ед/мкл), реагента Master-Mix (от 5 до 15 мкл) и воды.

В качестве стандартного протокола амплификации для ПЦР использовали следующие параметры реакционной смеси: концентрация

ионов магния — 2 ммоль/л, концентрация дезоксирибонуклеотидтрифосфатов — 0,1 ммоль/л, концентрации олигонуклеотидов в равных соотношениях — 500 нмоль/л каждого (в состав смеси включены прямые и обратные олигонуклеотидные праймеры), количество единиц активности термостабильной полимеразы — 1,25, количество ДНК на реакцию порядка 250 нг. Объем реакционной смеси составил 25 мкл. Для приготовления реакционной смеси использовали реагенты производства ООО «Праймтех» (Беларусь).

Стандартные условия термоциклирования включали стадию первичной денатурации при +95 °С и двухступенчатый цикл амплификации +95 °С — 10 с, градиент +(56–65) °С — 59 с. Количество циклов амплификации 40. Регистрация изменений базового уровня флуоресценции проводилась после стадии отжига/элонгации (после градиента).

В результате проведенной оптимизационной ПЦР установлено, что оптимальной является температура этапа отжига/элонгации равная +57 °С, при этом, вероятно, ввиду наличия значительного числа гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров внутреннего контроля/мишени, эффективность реакции на других температурах резко снижена. В случае с оптимизацией ПЦР диапазон температур, в которых эффективность реакций мишени и контроля близка к оптимальной, в значительной мере шире и находится в пределах +(56–59) °С.

Установлено, что понижение концентрации моновалентных ионов до 9 мМ, концентрации двухвалентных ионов до 0,8 мМ и повышение температуры этапа отжига/элонгации до +62 °С позволяет сместить равновесие процесса образования наиболее стабильной вторичной шпильчатой структуры, что выражается в возрастании изменения свободной энергии Гиббса с $\Delta G = -0.8$ kcal/mol до $\Delta G = 0.05$ kcal/mol. В то же время вторая наиболее стабильная структура также может быть охарактеризована положительным изменением энергии Гиббса ($\Delta G = -0.33$ kcal/mol переходит в $\Delta G = 0.39$ kcal/mol). Остальные структуры не выявляются.

Результаты анализа последовательностей олигонуклеотидов ампликона показали отсутствие риска образования стабильных гомодимеров ампликона на этапе отжига/элонгации при корректировке состава реакционной смеси и температурного режима амплификации. Термодинамические характеристики гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров свидетельствуют в пользу достаточно сильных негативных эффектов на реакцию. Корректировка

может быть реализована за счет повышения общей концентрации прямого праймера.

По результатам исследований был подобран оптимальный состав амплификационной смеси для выявления полиморфизма Sp1 (G1546T) гена альфа-1 цепи коллагена 1 *COL1A1*: 1 мкл геномной ДНК (100 мкг/мкл), 0,4 мкл каждого праймера (5 мМ), 0,2 мкл Taq полимеразы (1 Ед/мкл), 5 мкл Master-Mix, 13,0 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом (DEPC); конечный объем — 20 мкл.

При оптимизации программы амплификации варьировали длительность горячего старта (от 1 до 10 мин); длительность этапа денатурации (от 10 до 60 с); длительность (от 30 до 60 с) и температура (от 58 до 65 °С) этапа отжига; количество циклов амплификации (от 35 до 50). По результатам проведенных исследований были выбраны оптимальные варианты программы амплификации.

Условия термоциклирования для выявления полиморфизма Sp1 (G1546T) гена альфа-1 цепи коллагена 1 *COL1A1*: 94 °С — 4 мин (горячий старт); 35 циклов — 94 °С — 45 с (денатурация), 57 °С — 45 с (отжиг), 72 °С — 5 с (элонгация); 72 °С — 1 мин.

Разработка метода определения уровней нормализованной экспрессии гена COL1A1. На первом этапе исследования с использованием программного обеспечения Vector NTI нами были подобраны специфические олигонуклеотидные пары праймеров (forward и reverse), а также TaqMan-зонд (probe) для определения уровней нормализованной экспрессии гена *COL1A1*.

С помощью демонстрационной версии коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 и встроенного приложения AlignX выбранные последовательности «выравнивали» для выбора наиболее консервативных участков). Далее проводили «выравнивание» последовательностей ДНК исследуемого гена.

Дизайн олигонуклеотидов осуществляли последовательно для выбранного гомологичного участка с использованием бесплатного программного онлайн приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн алгоритма mfold/DNAfold.

На основании проведенных исследований нами подобраны пары праймеров (forward и reverse) и TaqMan-зонд (probe) для гена *COL1A1*: forward — CCTGGAATGAAGGGACACAGAGGT; reverse — TGACCAGGAGCTCCATTTTCACCA; probe — FAM-TGCTGGTCTCTGCTGGTCTCCTA-BHQ1.

Проведена оценка специфичности выбранного набора олигонуклеотидных праймеров и зонда с использованием онлайн-прило-

жения NCBI/Blast, в результате которой установлена 100%-я гомология геному человека и отсутствие гомологии с другими организмами.

Для дизайна олигонуклеотидных праймеров внутреннего контроля ПЦР в режиме реального времени использовали последовательность ДНК гена *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase human) генома человека. Дизайн олигонуклеотидов начали с последовательности, расположенной в начале гена и протяженностью 1200 п.о. (таблица 4).

Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров осуществлен анализ последовательности предполагаемого ампликона Ic AGCGGTAACCATGCGTATT TGACACACGAAGGAAGCTAGGGAAAAGGCAT TAGGTCAATTTCAAGCCGAAATTCACATGTG.

В результате анализа с использованием алгоритма mfold установлено, что во время протекания ПЦР, а именно на стадии отжига/элонгации при +60 °С все вероятные вторичные шпилечные структуры будут нестабильны. Анализ с использованием алгоритма Vector NTI показал наличие 29 вероятных вторичных шпилечных структур. Стабильных структур выявлено не было. Результаты анализа олигонуклеотидных праймеров показали практически полное отсутствие негативных эффектов за счет гомо- и гетеродимеров. Проведено моделирование совместимости внутреннего контроля и олигонуклеотидных праймеров для амплификации участков гена *COL1A1* в условиях мультиплекс-ПЦР (две реакции в одной пробирке). При постановке совместных мультиплекс реакций следует учитывать вероятные гетеродимеры олигонуклеотидов и компенсировать их исходя из пропорций и процентного соотношения стабильный гетеродимер/нестабильный гетеродимер. Как правило, является достаточным повышение концентрации олигонуклеотидов до 500–600 нМ.

Анализ вероятности совместного протекания специфической реакции с набором олигонуклеотидов гена *COL1A1* и внутреннего контроля показал, что в большинстве случаев выбранные олигонуклеотиды последнего не образуют стабильных гетеродимеров в условиях протекания этапа отжига/элонгации ПЦР.

Для анализа возможности использования подобранных пар праймеров и зондов при определении экспрессии исследуемого гена проводили моноплексную ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Амплификацию для каждого гена проводили в 10 образцах, пробы ставили в дублях.

Состав амплификационной смеси был следующим: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 3 мкл смеси F-праймер — R-праймер — Р-зонд (все компоненты данной смеси в концентрации 3,2 пмоль/мкл) и 3 мкл соответствующей кДНК.

На основании расчета температуры отжига пар праймеров была выбрана программа амплификации: 95 °С — 15 мин; 50 циклов: 95 °С — 20 с, 58 °С — 20 с, 72 °С — 15 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин при использовании термоциклера Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). Детекцию проводили по каналу Green, так как зонды для всех генов были мечены флуорофором FAM. Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР в режиме реального времени, для всех исследуемых генов находились в пределах от 20,05 до 32,84.

Количественное определение house-keeping гена проводили в тех же образцах, в которых оценивали амплификацию исследуемого таргетного гена, для оценки концентрации применяли плазмидный стандарт. Амплификацию всех проб проводили в дублях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций.

В ходе оценки эффективности протекания реакции амплификации для выбранного референсного гена *HPRT1* было установлено, что при использовании подобранных пар праймеров, зонда, состава реакционной смеси и условий амплификации (которые были использованы и для таргетных генов) рассчитанное значение эффективности протекания реакции составило 1,67. Сравнение эффективностей протекания реакции для референсного гена *HPRT1* и исследуемого гена *COL1A1* позволило сделать вывод о возможности проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации таргетного и референсного генов в одной пробирке.

Таблица 4 — Последовательности выбранных специфических олигонуклеотидных праймеров для амплификации уникальных участков геномной ДНК человека, ген *HPRT1*

Олигонуклеотид	Последовательность	Мод. 5'	Мод. 3'
Ic-F	AGCGGTAACCATGCGTATTT	Нет	Нет
Ic-R	CACATGTGAATTTCTGGCTTG	Нет	Нет
Ic-P	GAAGGAAGCTAGGGAAAAGGCA	ROX	BHQ2

В ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-РВ в одной пробирке одновременно амплифицировали исследуемый ген *COL1A1* и референсный ген *HPRT1*. Детекцию таргетного гена проводили по каналу Green, так как зонды были мечены флуорофором FAM, а детекцию гена *HPRT1* проводили по каналу Orange, так как зонд для него был мечен флуорофором ROX.

В пробирки для амплификации вносили: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда таргетного гена *COL1A1*, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда для гена *HPRT1* и 3 мкл кДНК.

Для выбора оптимального режима амплификации при проведении мультиплексной ПЦР были опробованы 4 режима (таблица 5) с учетом оптимальной температуры отжига праймеров и одновременной амплификации двух генов в одной пробирке. Амплификацию проводили с использованием термоциклера Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия).

Наилучший результат амплификации для гена *COL1A1* был достигнут при использовании режима 1. Значения пороговых циклов для таргетного гена находились в пределах от 19,55 до 25,83, для референсного гена *HPRT1* — от 21,86 до 27,99.

Для апробации разработанного метода расчет уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) таргетного гена (таблица 6) осуществляли по формуле

$$\% \text{ уровня экспрессии} = \frac{2^{-(Ct \text{ интересующего гена} - Ct \text{ гена } HPRT1)}}{100} \times 100 \%,$$

где *Ct* — пороговый цикл.

Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-РВ, позволил сделать вывод, что разработанный метод можно использовать для одновременной амплификации таргетного гена *COL1A1* и референсного гена *HPRT1*. Полученные с использованием разработанного метода данные можно использовать для расчета процента уровня нормализованной экспрессии гена *COL1A1*. Рассчитанные значения процента уровня нормализованной экспрессии генов находились в пределах от 12,50 до 397,24 %.

Заключение. Дизайн олигонуклеотидов, осуществленный для выбранного гомологичного участка с использованием бесплатного программного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн-алгоритма mfold/DNAfold позволил оценить вероятность образования вторичных шпильчатых структур ампликона, а также вероятность стерических препятствий для связывания олигонуклеотидных праймеров и выбрать наиболее оптимальные варианты. С использованием онлайн-приложения NCBI/Blast подтверждена высокая специфичность выбранного набора олигонуклеотидных праймеров. В ходе проведенных исследований оптимизированы состав ампли-

Таблица 5 — Тестируемые программы амплификации для гена *COL1A1*

Режим	Программа амплификации
1	1 цикл: 95 °С — 15 мин; 50 циклов: 95 °С — 20 с, 58 °С — 20 с, 72 °С — 15 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин
2	1 цикл: 95 °С — 10 мин; 45 циклов: 95 °С — 20 с, 58 °С — 20 с, 72 °С — 15 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин
3	1 цикл: 94 °С — 10 мин; 45 циклов: 94 °С — 20 с, 58 °С — 20 с, 72 °С — 20 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин
4	1 цикл: 94 °С — 15 мин; 50 циклов: 94 °С — 20 с, 58 °С — 20 с, 72 °С — 20 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин

Таблица 6 — Значение пороговых циклов и УНЭ для гена *COL1A1*

Ген	Значения пороговых циклов (Ct) для образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>COL1A1</i>	25,18	25,33	19,55	23,94	22,27	23,00	21,23	20,32	24,79	25,83
<i>HPRT1</i>	27,99	23,34	21,86	23,67	22,03	23,85	22,52	23,32	23,35	27,42
% УНЭ	14,26	397,24	20,17	20,58	118,10	55,48	40,90	12,50	271,32	33,22



фикационной смеси и условия термоциклирования для изучения полиморфизма Sp1 (G1546T) гена альфа-1 цепи коллагена 1 *COL1A1*.

Подобранные нуклеотидные последовательности пар праймеров и молекулярных зондов, меченных флуоресцентными краси-

телями, позволяют проводить амплификацию гена *COL1A1*, а также гена человека *HPRT1* с применением ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в мультиплексной формате для определения уровней нормализованной экспрессии указанного таргетного гена.

Список цитированных источников

1. Грудянов, А. И. Заболевания пародонта. — М. : Медицинское информационное агентство, 2009. — 336 с.
2. Заболевания пародонта и «системные болезни»: известное прошлое. многообещающее будущее / С. Д. Арутюнов [и др.] // Пародонтология. — 2009. — № 1. — С. 3–6.
3. Атрушкевич, В. Г. Остеопороз и пародонтит / В. Г. Атрушкевич // Пародонтит : монография ; под ред. Л. А. Дмитриевой. — М. : МедПресс, 2004. — С. 350–355.
4. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women / J. A. Kanis [et al.] // Osteoporos. Int. — 2013. — Vol. 24 (1). — P. 23–57. DOI: 10.1007/s00198-012-2074-y.
5. Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предиктивную медицину / В. С. Баранов [и др.]. — СПб. : Интермедика, 2000. — 263 с.
6. Association analysis of the *COL1A1* polymorphism with bone mineral density and prevalent fractures in Polish postmenopausal women with osteoporosis / J. Dytfeld [et al.] // Arch. Med. Sci. — 2016. — Vol. 12 (2). — P. 288–294. DOI:10.5114/aoms.2016.59253.
7. Наследов, А. Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных / А. Д. Наследов. — СПб. : Питер, 2008. — 416 с.

Development of in-house test systems for molecular genetic diagnosis of structural polymorphism and functional state of the Alpha-1 gene of the collagen 1 chain (*COL1A1*), participated in the regulation of bone homeostasis

Poluyan O. S., Kostiuk S. A., Melnikova T. Yu., Yudina N. A.

State Educational Establishment “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”, Minsk, Republic of Belarus

Chronic periodontitis is defined as the destruction of the supporting tissues of the teeth and the resorption of the alveolar bone, which also occurs as a result of genetically determined processes. The main role in the formation of periodontitis belongs to the gene encoding the alpha 1 protein chain of collagen 1. Certain polymorphisms in this gene are associated with an increase in the production of this chain, which leads to a violation of the ratio between the protein chains in collagen 1. The production of collagen with a disturbed structure is one of the factors that increase the likelihood of destruction of connective and bone tissues.

Keywords: alpha-1 collagen 1 chain, polymorphism, normalized expression level, primers, amplification program.

Поступила 10.06.2022