



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010138109/10, 15.09.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.09.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.09.2010

(45) Опубликовано: 20.03.2012 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2343480 C2, 10.01.2009. RU 2008146886 A, 20.07.2010. EP 964929 B1, 20.10.2004. WEITZEL J.N. et al., Evidence for common ancestral origin of a recurring BRCA1 genomic rearrangement identified in high-risk Hispanic families, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007, v.16, n.8, p.1615-1620. JAZAERI A.A. et al., Gene expression profiles of (см. прод.)

Адрес для переписки:
117452, Москва, ул. Ялтинская, 4, корп.3,
кв.260, Е.В. Елисеевой

(72) Автор(ы):

Ребриков Денис Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии
медицинских наук Российский
онкологический научный центр им. Н.Н.
Блохина РАМН (RU),
Учреждение Российской Академии Наук
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
РАН (RU),
Российская Федерация, в лице Министерства
Образования и Науки РФ (RU)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПА ЧЕЛОВЕКА ПО ПОЛИМОРФИЗМУ В ПОЗИЦИИ 4343 ГЕНА BRCA1 (rs1799950)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для определения генотипа человека по полиморфизму в позиции 4343 гена BRCA1 (rs1799950). Способ заключается в использовании аллель-специфичных праймеров с регистрацией результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых проб. Реакционная

смесь включает праймеры, отличающиеся для каждого аллеля, и общие для двух аллелей праймер и пробу, а также общий флуоресцентный зонд. Изобретение позволяет снизить затраты на генетические исследования и повысить их доступность за счет использования стандартного оборудования и применения только одного меченого зонда. 1 ил.

(56) (продолжение):

BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers, J. Natl. Cancer Inst., 2002, v.94, n.13, p.990-1000.

RU 2 4 4 5 3 7 3 C 1

RU 2 4 4 5 3 7 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010138109/10, 15.09.2010

(24) Effective date for property rights:
15.09.2010

Priority:

(22) Date of filing: 15.09.2010

(45) Date of publication: 20.03.2012 Bull. 8

Mail address:
117452, Moskva, ul. Jaltinskaja, 4, korp.3,
kv.260, E.V. Eliseevoj

(72) Inventor(s):

Rebrikov Denis Vladimirovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Uchrezhdenie Rossijskoj akademii meditsinskikh
nauk Rossijskij onkologicheskiy nauchnyj tsentr
im. N.N. Blokhina RAMN (RU),
Uchrezhdenie Rossijskoj Akademii Nauk Institut
obshchej genetiki im. N.I. Vavilova RAN (RU),
Rossijskaja Federatsija, v litse Ministerstva
Obrazovaniya i Nauki RF (RU)

**(54) METHOD FOR HUMAN GENOTYPE DETERMINATION BY 4343 GENE BRCA1 (rsL799950)
POSITION POLYMORPHISM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention may be used for human genotype determination by 4343 gene BRCA1 (rsL799950) position polymorphism. The method consists in using allele-specific primers with real-time PCR values recording with using fluorescence marked probes. A reaction mixture contains the

primers different for each allele, the primer and the probe common for two alleles, and also the common fluorescent probe.

EFFECT: invention provides cutting expenses for genetic researches and making them more available due to the use of standard equipment and only one marked probe.

2 dwg

RU 2 4 4 5 3 7 3 C1

RU 2 4 4 5 3 7 3 C1

1. Область техники.

Предложенный способ относится к области медицины, биологии и биотехнологии и может быть использован при определении генотипа человека по полиморфизму в позиции 4343 гена BRCA1 (rs1799950) с отнесением исследуемого образца к гетерозиготе или гомозиготе по одному из аллельных вариантов.

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием у женщин: он поражает как минимум каждую десятую жительницу развитых стран и занимает лидирующие позиции по смертности вследствие несовершенства ранней диагностики. Индивидуальный риск РМЖ зачастую ассоциирован с отягощенной наследственностью, т.е. онкологическими мутациями, связанными с риском развития РМЖ. Говоря о выявлении лиц, относящихся к группе риска по развитию РМЖ, необходимо учитывать идентифицированные и охарактеризованные к настоящему времени гены - маркеры, мутации в которых приводят к развитию рака молочной железы и рака яичника. Одним из таких генов является ген BRCA1.

2. Уровень техники.

Из литературных данных известно, что у жительниц России примерно 20% РМЖ, возникших в молодом возрасте (до 40-50 лет) на фоне неблагоприятной наследственности, объясняются мутациями в гене BRCA1. Для ряда мутаций гена BRCA1 показана устойчивая ассоциация с возрастанием риска развития РМЖ на протяжении жизни на 50-80%. Одной из таких мутаций является полиморфизм в позиции 4343 гена BRCA1 (rs1799950).

Широко распространен способ определения типа нуклеотида, находящегося в определенном месте ДНК, основанный на использовании аллель-специфичных праймеров с регистрацией результатов ПЦР по окончании реакции с помощью электрофореза.

Известны различные способы, позволяющие определить тип нуклеотида, находящегося в определенном месте ДНК, основанные на использовании аллель-специфичных праймеров с регистрацией результатов ПЦР непосредственно в ходе реакции с помощью использования флуоресцентно-меченых проб (олигонуклеотидов) (Andreas R. Tobler at all, "THE SNPlex Genotyping System: A Flexible and Scalable Platform for SNP Genotyping", Journal of Biomolecular Techniques, V. 16, issue 4, December 2005).

При использовании ПЦР с регистрацией результатов в ходе реакции известны различные способы определения генотипа исследуемого образца.

Например, в наборах производства Applied Biosystems используют одну пару праймеров для каждого аллеля и два зонда с различными флуоресцентными метками, в зависимости от генотипа аллеля фиксируют разгорание различных меток ("TaqMan SNP Genotyping Assays", Applied Biosystems, Produkt Bulletin, USA, 06/2006). Недостатком способа, используемого в данных наборах, является его высокая стоимость.

Предлагаемое изобретение делает более доступным и удешевляет подобные исследования, благодаря использованию стандартного оборудования и применению только одного меченого зонда.

3. Раскрытие изобретения.

Техническим результатом, на достижение которого направлено предлагаемое изобретение, является повышение доступности подобных исследований, поскольку способ может быть осуществлен на стандартном известном оборудовании. Также он обеспечивает возможность применения лишь одного меченого зонда, что снижает

затраты на исследование.

Указанный результат достигается путем использования при постановке ПЦР аллель-специфичных праймеров на участок с искомой заменой, отличающихся для каждого аллеля, и общих для двух аллелей праймера и зонда следующего нуклеотидного состава:

Праймер (нуклеотид А)

BRCA1-43431 5'-CTCTGAGCATGGCAGTTCT-3'

Праймер (нуклеотид G)

BRCA1-43432 5'-CTCTGAGCATGGCAGTTCC-3'

Общий праймер

BRCA1-43433 5'-GTAGAAAAGGCTGAATTCT-3'

Общий зонд

BRCA1-4343t(BHQ1)-5'-GATAGCGGAC(FdT)CCCAGCACAG-3'-Р

где BHQ1 означает присоединенный к 5'-концевому нуклеотиду темновой гаситель флуоресценции, а FdT - флуоресцентный краситель FAM, присоединенный к нуклеотиду Т.

Дополнительно в реакционную смесь включают следующие стандартные

компоненты:

- смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов четырех типов;

- реакционный буфер (100 мМ Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 500 мМ KC1, 0.8% P40, 20 мМ MgCl₂);

- бидистилированная вода;

- Taq-полимераза;

- минеральное масло;

- парафин.

На чертеже (фиг.1) показан пример графиков накопления ДНК, полученных для аллель-специфичных реакций с использованием детектирующего амплификатора. Ось координат «х» - это уровень флуоресценции, «у» - номер цикла. График А - результат исследования гомозиготного образца (кривые изображены в линейном масштабе). График Б - результат исследования гетерозиготного образца (кривые изображены в линейном масштабе).

ПЦР проводят в отдельных пробирках для каждого варианта аллеля. Для того чтобы отличить два аллеля, используют праймер на участок с исходной заменой, отличающийся для каждого аллеля, и общий для двух аллелей праймер.

В результате указанного выбора праймеров и зонда можно судить о генотипе исследуемого образца по форме и расположению кривых накопления ДНК.

4. Осуществление изобретения.

В качестве материала для исследования рекомендуется использовать кровь, соскобы буккального эпителия, биоптаты мягких тканей человека. Выделение ДНК из биоматериала производится с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК (не является предметом данного патента).

В данную реакционную смесь добавляют образец ДНК и проводят ПЦР в режиме реального времени, регистрацию сигнала осуществляют с помощью детектирующего амплификатора.

Генотип (аллельный состав) исследуемого образца определяют после окончания программы амплификации по соотношению пороговых циклов для каждого из продуктов ПЦР (пороговый цикл - номер температурного цикла ПЦР, на котором детектирующий амплификатор зарегистрировал появление специфичного сигнала для

данного типа продукта реакции) следующим образом:

1. Определяют среднее значение порогового цикла (Ct) для ПЦР-дублей.

2. Определяют разницу между Ct (ΔCt) для двух аллелей.

Для исследуемого образца возможны следующие варианты относительного расположения кинетических кривых:

5 А) ΔCt между кинетическими кривыми, описывающими две реакции, находится в диапазоне от 4 циклов и выше. Такой образец следует интерпретировать как гомозиготный по исследуемому полиморфизму. Генотип в этом случае соответствует 10 аллелю с меньшим Ct.

Б) ΔCt между кинетическими кривыми, описывающими две реакции, находится в диапазоне от 0 до 2 циклов. Такой образец следует интерпретировать как гетерозиготный по исследуемому полиморфизму.

15 Для применения данного способа в промышленном масштабе компоненты реакционной смеси возможно выпускать в наборе, готовом для применения:

- пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, включающие реакционный буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные зонды;

20 - пробирки с раствором Таq-полимеразы;

- пробирки с минеральным маслом.

При использовании данного набора в пробирки со смесью для амплификации добавляют раствор Таq-полимеразы, минеральное масло и подготовленный образец 25 ДНК.

Формула изобретения

Способ определения генотипа человека по полиморфизму в позиции 4343 гена BRCA1 (rs1799950), основанный на использовании аллель-специфичных 30 праймеров с регистрацией результатов ПЦР в реальном времени, характеризующийся тем, что используются праймеры, отличающиеся для каждого аллеля, общий для двух аллелей праймер и общий флуоресцентный зонд следующего нуклеотидного состава:

Праймер (нуклеотид А)

BRCA1-434315'-CTCTGAGCATGGCAGTTCT-3'

35 Праймер (нуклеотид G)

BRCA1-434325'-CTCTGAGCATGGCAGTTCC-3'

Общий праймер

BRCA1-434335'-GTAGAAAAGGCTGAATTCT-3'

40 Общий зонд

BRCA1-4343t(BHQ1)-5'-GATAGGCGGAC(FdT)CCCAGCACAG-3'-P,

где BHQ1 означает присоединенный к 5'-концевому нуклеотиду темновой гаситель флуоресценции, а FdT - флуоресцентный краситель FAM, присоединенный к нуклеотиду Т,

45 и после проведения ПЦР с использованием указанных праймеров определяется среднее значение порогового цикла (Ct) для ПЦР-дублей и фиксируется разница между Ct (ΔCt) для двух аллелей, и если ΔCt между кинетическими кривыми, описывающими две реакции, находится в диапазоне от 0 до 2 циклов, такой образец

50 следует интерпретировать как гетерозиготный по исследуемому полиморфизму, а если ΔCt между кинетическими кривыми, описывающими две реакции, находится в диапазоне от 4 циклов и выше, то такой образец следует интерпретировать как гомозиготный по исследуемому полиморфизму, а генотип в этом случае соответствует

аллелю с меньшим Ct.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Пример графиков накопления ДНК

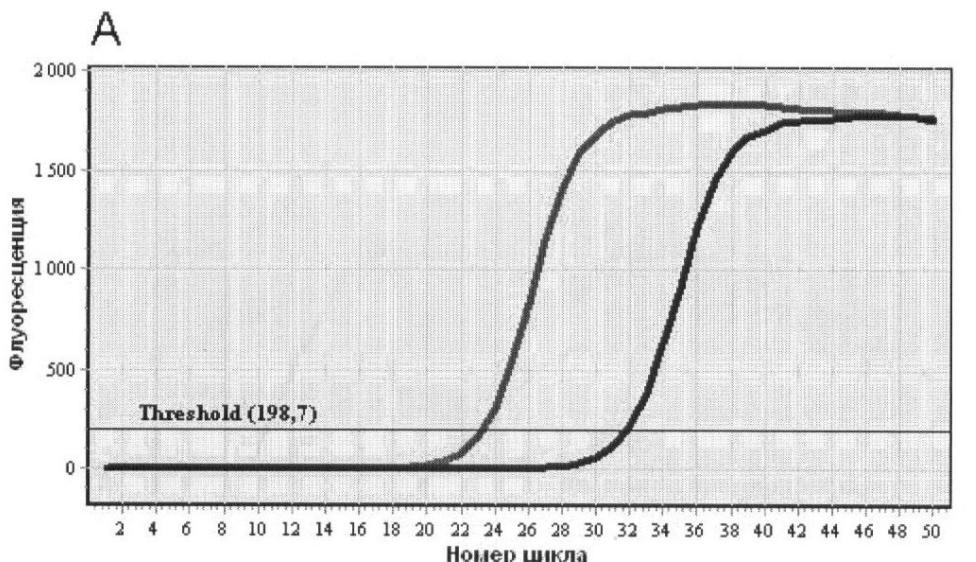


График А. Результат исследования гомозиготного образца (линейный масштаб)

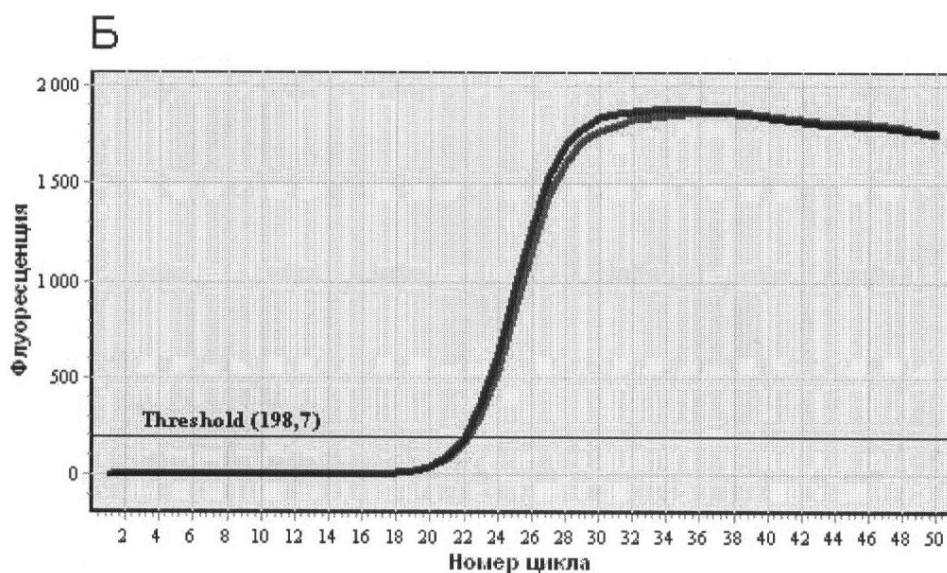


График Б. Результат исследования гетерозиготного образца (линейный масштаб)

Фиг.1