

VYUŽITÍ JEDNOKAPILÁROVÉHO OBOUSMĚRNÉHO SEKVENOVÁNÍ PRO GENOTYPIZACI *TGFβ1* GENU

MARTIN BERÁNEK^a, MONIKA DRASTÍKOVÁ^a, IGOR SIRÁK^b, SIMONA PAULÍKOVÁ^b, MILAN VOŠMIK^b a JIŘÍ PETERA^b

^a Ústav klinické biochemie a diagnostiky, ^b Klinika onkologie a radioterapie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové
beranek@lfhk.cuni.cz

Došlo 12.4.13, přijato 17.6.13.

Klíčová slova: konfirmace, DNA, sekvenování, PCR, primer, gen *TGFβ1*

Úvod

Konfirmační analýzy hrají v molekulární biologii nezastupitelnou úlohu. Ověřují úspěšnost provedených experimentů (např. při cílené mutagenезi, molekulárním klonování, konstrukci rekombinantních virů či syntetických chromosomů), doplňují a potvrzují výsledky analýz DNA získané jinými vyšetřovacími postupy (diagnostika infekčních nebo geneticky podmíněných chorob) a uplatňují se také při přípravě referenčních materiálů určených pro mezilaboratorní porovnávací zkoušky^{1,2}.

Základem konfirmačních molekulárně biologických analýz jsou sekvenační metody v mnoha podobách, od klasického Sangerova sekvenování³, přes multikapilární sekvenování s fluorofory⁴, klasické pyrosekvenování v mikrotitrační destičce⁵, minisekvenování⁶ až po sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS)⁷.

Nezbytnou podmínkou konfirmačního sekvenování je znalost referenční sekvence získané buď z příslušné databáze, nebo vyšetřením zdravých jedinců ze sledované populační skupiny. Pro dosažení jednoznačných závěrů je při konfirmaci nutno pracovat s nejvyšší dosažitelnou spolehlivostí. Metody založené na Sangerově sekvenování mají spolehlivost 90–98 % podle délky sekvenovaného úseku⁸, NGS mohou podle některých pramenů dosahovat spolehlivosti blízké 99,9 % (cit.^{7,9}).

Při konfirmaci se zpravidla sekvenují obě vlákna DNA – zejména při analýze dlouhých a komplikovaných úseků, při nálezů nové mutace nebo řidce se vyskytujících alelických variant. U obousměrného sekvenování je tak nezbytné provést dvě různé sekvenační reakce s primery specifickými pro obě vlákna daného ampliconu.

Naše předešlé experimenty se týkaly možnosti dideoxynukleotidového sekvenování v multiplexním uspořádání

založeném na hyperadenylovaném chvostu připojeném k 5'-konci jednoho ze sekvenačních primerů. Adenylace primeru zpožďovala migrační časy příslušných produktů sekvenační reakce a při elektroforéze tak bylo možno získat oddělená sekvenační data pro oba sledované amplicony¹⁰. Cílem této navazující studie bylo vyzkoušet zmíněný přístup u obousměrného konfirmačního sekvenování, tj. provést syntézu sekvenačních fragmentů obou vláken ampliconu v jedné reakční směsi, a poté kapilární elektroforézou analyzovat získané fragmenty v jediné kapiláře.

Pro modelový experiment byl zvolen úsek promotoru genu *TGFβ1* (lokalizace 19q13.1). Genetický polymorfismus -1552delAGG (rs11466313), jenž se nachází v této části genu, ovlivňuje expresi transformujícího růstového faktoru β1 (*TGFβ1*)¹¹ a může přispět k vyšší radiosenzitivitě nositelů této delece. Zvýšenou radiosenzitivitu lze pozorovat například po absolvované radioterapii karcinomu děložního čípku¹². Závažné pozdní komplikace radioterapie postihují 10–15 % takto léčených žen.

Experimentální část

Charakteristika vyšetřovaných vzorků

Ve studii bylo vyšetřeno 148 vzorků DNA. Experimentální skupinu tvořily vzorky DNA od 46 pacientek Kliniky onkologie a radioterapie FN Hradec Králové (medián věku 55 roků, věkový rozsah souboru 33 až 76 roků) s diagnózou karcinom děložního čípku, u nichž se v období po radioterapii vyskytovaly nežádoucí účinky v oblasti zažívacího traktu, močového měchýře, dělohy nebo v pánevní kosti. Kontrolní skupinu tvořilo 102 zdravých žen, jejichž DNA byla získána s jejich informovaným souhlasem (medián věku 26 roků, rozsah 22–56 roků). DNA byla izolována z periferní krve (experimentální skupina) a z buněk bukalní sliznice (kontrolní skupina) pomocí mikrokolonkového systému QIAamp Mini Blood Kit, Qiagen, SRN. Genetický polymorfismus -1552delAGG byl vyšetřen metodou fragmentační analýzy a poté následovalo obousměrné konfirmační sekvenování.

Fragmentační analýza

Amplifikační směs o objemu 25 μl obsahovala 2,5 μl 10× koncentrovaného PCR pufru s chloridem hořečnatým o koncentraci 15 mmol l⁻¹ (Takara, Japonsko), deoxynukleotidy (finální koncentrace ve směsi 200 μmol l⁻¹, Takara, Japonsko), amplifikační primery (0,4 μmol l⁻¹, Genери Biotech, ČR), 1,5 U *Taq* HS DNA polymerasy (Takara, Japonsko) a 20 ng DNA. Přímý (forward) primer byl na 5'-konci označen 6-karboxyfluoresceinem (FAM): 5'-FAM - CCA GGT GGA AGG TGG ATT AG -3'; sekvence reverzního primeru byla: 5'- CTC CAG TCC CCA GGT AAC CAT C -3'. Teplotní podmínky pro PCR v termocykléru T3000 (Biometra, SRN) zahrnovaly počá-

teční denaturaci 5 min při 95 °C a 30 amplifikačních cyklů (denaturace 30 s při 95 °C, hybridizace 30 s při 60 °C, elongace 30 s při 72 °C). Délka specifické sekvence ampliconu byla 131 bp v případě „wild-type“ alely a 128 bp u varianty -1552delAGG.

Směs k provedení fragmentační analýzy se skládala z 3 µl ampliconu (stokrát předředěného), 0,3 µl velikostního standardu LIZ 500 (Applied Biosystems, USA) a 26,7 µl formamidu. Po pětiminutové tepelné denaturaci směsi při 95 °C byl proveden elektrokinetický nástřik vzorku (16 s při 1,2 kV) do 50cm kapiláry genetického analyzátoru ABI 3130 (separační gel POP7, Applied Biosystems, USA). Kapilární elektroforéza probíhala 30 min při 15 kV a 60 °C. Pro hodnocení migrace fragmentů byl použit program Gene Mapper, verze 3.2 (Applied Biosystems, USA).

Konfirmační sekvenování s primery opatřenými CA adaptéry

Amplicony, získané za podmínek obdobných jako při fragmentační analýze a s neznačenými primery, byly purifikovány soupravou QIAquick Gel Purification System (Qiagen, SRN). Sekvenační reakce obsahovala 8 µl komerční reakční směsi s pufrům a optimalizovaným množstvím chloridu hořečnatého, deoxynukleotidů, dideoxynukleotidů a termostabilní DNA polymerasy („BigDye X Terminator Kit“ verze 3.1, Applied Biosystems, USA), dále 5 µl purifikovaného ampliconu, 4 µl demineralizované vody, 2 µl přímého sekvenačního primeru ředěného na koncentraci 10 µmol l⁻¹ a 1 µl reverzního primeru o téže koncentraci. Oba sekvenační primery obsahovaly na 5'-konci adaptérový chvost složený z CA repetice, jež byl ke specifické části primeru připojen spojníkem (spacer C3, IDT, USA). Složení přímého sekvenačního primeru bylo následující: 5'- (CA)₅₅ - C3 - CCA GGT GGA AGG TGG ATT AGA GAG GGG CAA GAA AG -3', složení reverzního primeru: 5'- (CA)₁₀ - C3 - ACC ATC ATG GGC CTT GTC AG -3' (IDT, USA). Reverzní primer hybridizoval k vnitřní části sekvenovaného ampliconu.

Dvoutepelní profil sekvenační reakce se skládal z denaturace 20 s při 95 °C a hybridizace/elongace 4 min při 50 °C (35 reakčních cyklů). Produkty reakce byly přečištěny soupravou „BigDye X Terminator Purification Kit“, Applied Biosystems, USA). Sekvenační fragmenty (bez delece) měly díky přítomnosti dideoxynukleotidů, CA adaptérů a struktúře specifické části primerů tyto délky: přímé vlákno 146–226 nukleotidů, reverzní vlákno 41–137 nukleotidů (včetně posledního nukleotidu s adeninem přidávaného *Taq* polymerasou). Pro kapilární elektroforézu byl použit elektrokinetický nástřik fragmentů při 1,6 kV po dobu 10 s; separace fragmentů probíhala při 8,5 kV a teplotě 60 °C po dobu 40 min.

Statistické hodnocení dat

Pro porovnání frekvencí alelických variant a genotypů ve sledovaných souborech a pro hodnocení rozložení

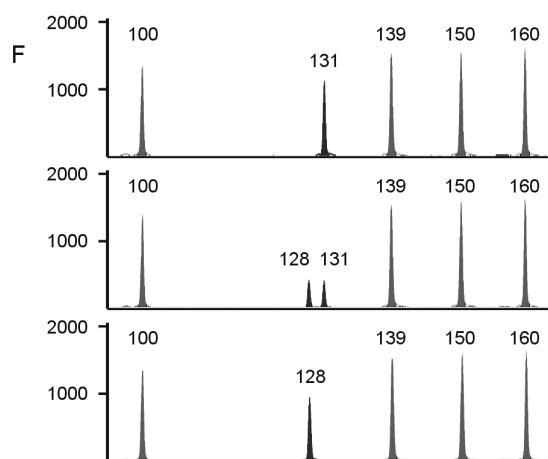
alel podle Hardy-Weinbergovy rovnováhy byl použit chí-kvadrátový test. Za statisticky významnou byla považována hodnota $P < 0,05$.

Výsledky

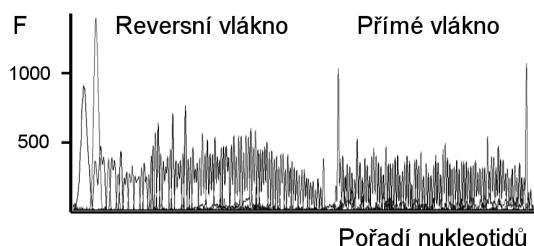
Frekvence alelické varianty -1552delAGG zjištěná ve vyšetřovaném souboru fragmentační analýzou byla 29 % a v kontrolní skupině 33 %. V souboru pacientek bylo prokázáno šest homozygotních nosiček delece -1552delAGG (13,0 %), 15 heterozygotek (32,6 %) a 25 žen bylo bez delece (54,4 %). Kontrolní skupina zahrnovala 7 homozygotních nosiček -1552delAGG (6,9 %), 54 heterozygotek (52,9 %) a u 41 žen nebyla delece prokázána (40,2 %). Rozdíly ve frekvencích alel a genotypů v obou sledovaných souborech nedosáhly statistické významnosti. Rozložení alel do genotypů v obou souborech odpovídalo Hardy-Weinbergově rovnováze.

Na obr. 1 je prezentován výsledek fragmentační analýzy ampliconů genu *TGFβ1* značených na 5'-konci 6-karboxyfluoresceinem. Horní elektroforeogram obsahuje fragment o délce 131 nukleotidů typický pro „wild-type“ alelu (tedy bez delece). Ve střední části je elektroforeogram heterozygota s fragmenty o délkách 131 a 128 nukleotidů. Dolní elektroforeogram homozygota pro -1552delAGG obsahuje jeden fragment o délce 128 nukleotidů.

Všechny výsledky fragmentační analýzy byly následně potvrzeny provedením dideoxynukleotidového sekvenování. Obousměrný záznam sekvenačních fragmentů přímého a reverzního vlákna je patrný na obr. 2. Vzhledem k délce CA adaptéru použitého u reverzního primeru (20 nukleotidů) mají fragmenty reverzního vlákna kratší migrační čas než fragmenty vlákna přímého, kde CA adaptér obsahoval 110 nukleotidů.



Obr. 1. Záznam výsledku fragmentační analýzy genetického polymorfismu -1552delAGG v *TGFβ1* genu



Obr. 2. Elektroforeogram získaný při obousměrném dideoxynukleotidovém sekvenování v jedné kapiláře

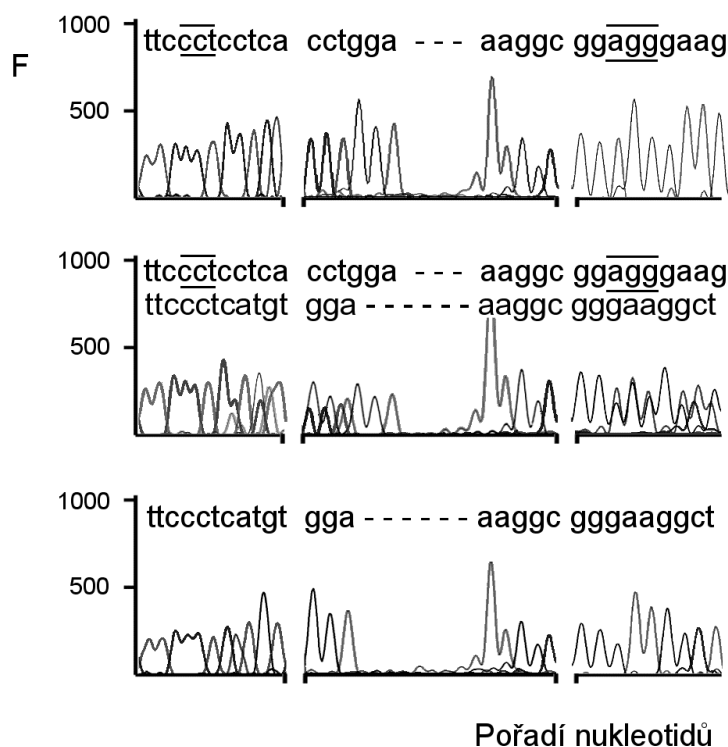
Obr. 3 obsahuje trojice segmentů elektroforeogramů získaných při sekvenování genu *TGFβ1* u osoby bez delecce -1552delAGG (horní část), heterozygota (střední část) a homozygota pro -1552delAGG (dolní část). První (levý) segment ukazuje část sekvence reverzního vlákna s vyznačením místa třínukleotidové delecce (podtržená sekvence CCT). Druhý segment znázorňuje mezeru mezi oběma vlákny sekvenovaného amplikonu (vyznačena přerušovanou čarou) s okrajovými sekvencemi 3'-konce reverzního vlákna a 5'-konce vlákna přímého. Třetí (pravý)

segment zahrnuje část sekvence přímého vlákna s místem třínukleotidové delecce -1552delAGG (podtržená část). Značení bází nukleotidů je uvedeno nad příslušnými sekvencemi, v případě heterozygota dvouřádkovým způsobem. Na posledním elektroforeogramu (homozygot pro -1552delAGG) je patrná zřetelně širší mezeru mezi sekvencemi obou vláken díky třínukleotidové delecce přítomné na obou alelách genu *TGFβ1*.

Diskuse

Několik dosud publikovaných prací prokázalo vliv genetického polymorfismu -1552delAGG na expresi *TGFβ1*, multifunkčního cytokinu důležitého pro regulaci buněčného cyklu^{11,13,14}. Místo delecce v promotoru genu *TGFβ1* ovlivňuje transkripci tohoto cytokinu patrně jako distální kontrolní element¹⁴. Současně bylo zjištěno, že se alelická varianta -1552delAGG vyskytuje v těsné vazbě s alelou -509C>T (cit.¹²), jejíž nosiči mívají vyšší koncentrace *TGFβ1* v krevním séru¹⁵.

Naše studie nepotvrdila zvýšený výskyt varianty -1552delAGG ve sledovaném souboru. Navzdory nízkému počtu provedených vyšetření se zdá, že přítomnost delecce sama o sobě nepodmiňuje rozvoj pozdních kompli-



Obr. 3. Segmenty elektroforeogramů z jednokapilárového dideoxynukleotidového sekvenování homozygota bez mutace (horní část), heterozygota (střední část) a homozygota pro delecce -1552delAGG (spodní část)

kací po radioterapii karcinomu děložního čípku. S ohledem na variantu -509C>T a další polymorfni místa v promotorové oblasti genu (-1960C>T, -1886G>A, -1571A>G, -1349insC, -1146C>G, -800G>A, -448C>T) bude při hledání příčin zvýšené exprese TGF β 1 a radiosenzitivity nezbytná haplotypová analýza a hodnocení většího počtu osob.

Převážná většina polymorfniích míst v promotoru i v kódující oblasti *TGF β 1* má charakter jednonukleotidových polymorfismů (např. L10P, R25P, T263I). Jednosměrnou konfirmaci výsledků dosažených jinou vyšetřovací metodou (analýzou restričních fragmentů¹⁶, analýzou teploty tání¹⁷, alelickou diskriminací¹⁸), včetně námi použité fragmentační analýzy, lze tudíž považovat za dostatečnou. V případě trinukleotidové delece -1552delAGG však při jednosměrné konfirmační analýze nelze stoprocentně odlišit sekvenační záznam heterozygota od kontaminace směsí jinou sekvenčí (obr. 3, prostřední elektroforeogram). U delečních a inserčních mutací při jednosměrném sekvenování také bývá obtížnější určit přesné místo a rozsah mutace. Obousměrné sekvenování je zde proto nezbytnou podmínkou správně provedené konfirmační analýzy.

Společným jmenovatelem metod používaných pro konfirmační sekvenování jsou bezesporu sekvenační reakce. Probíhají ve zkumavce, jamce mikrotitrační destičky, kapiláře, na podložním skle anebo v kapce emulze. Na rozdíl od PCR každá reakce obsahuje vždy jen jeden typ sekvenačního primeru; přítomnost jiného primeru komplementárního k vyšetřovanému amplikonu by způsobila vznik smíšené sekvence a nečitelnost získaného záznamu. Při cyklickém uspořádání klasické sekvenační reakce (30 až 40 reakčních cyklů) dochází z toho důvodu k nárůstu sekvenačních fragmentů aritmetickou řadou. Naše studie jednokapilárového obousměrného sekvenování zamezila vzniku smíšené sekvence připojením dlouhého CA adaptéru na 5'-konec jednoho z primerů, čímž bylo dosaženo rozdílných migračních časů pro fragmenty obou vláken amplikonu.

Nejdelší sekvenační fragmenty mohou při obousměrném uspořádání reakce sloužit v následujících cyklech jako templáty pro syntézu fragmentů vlákna opačného. Podmínkou je, že templáty tohoto typu musí svým 3'-koncem hybridizovat s opačně orientovaným primerem. Fragmentů dosahujících během polymerace této požadované délky vzniká v reakční směsi jen 5–10 % v závislosti na délce sekvenovaných úseků, místu hybridizace primerů, poměru koncentrací deoxynukleotidů a dideoxynukleotidů ve směsi, a také na teplotním profilu sekvenační reakce. Přestože při obousměrném sekvenování není možné očekávat amplifikační účinnost srovnatelnou s PCR, dosahovaly fluorescence našich sekvenačních fragmentů pětinašobný výšek v porovnání se standardní jednosměrnou syntézou. Tento fakt umožňuje při obousměrném uspořádání experimentu analyzovat až několikanásobně nižší počty amplikonů.

Oproti naší předešlé práci¹⁰ jsme k modifikaci 5'-konce přímého sekvenačního primeru nepoužili polyadenylační chvost, nýbrž adaptér složený z 55 CA repetit.

Důvodem byly technické problémy při kontrole čistoty vyrobených ultramerů. Způsobovala je zřejmě depurinace polyadenylačního chvostu při ionizaci molekul v hmotnostním spektrometru. Pro dosažení kompletní čitelnosti sekvenačních fragmentů reverzního vlákna jsme krátkým adaptérem opatřili také 5'-konec reverzního primeru, jak jsme popsali již dříve^{19,20}.

Oba použité adaptéry byly k 5'-koncům sekvenačních primerů připojeny přes spojníky (C3 spacery), jejichž struktura je založena na tříuhlíkovém skeletu²¹. Vložení spojníků zastavilo během cyklování sekvenační reakci těsně před místem napojení CA adaptéru. Tím při obousměrné syntéze zůstaly zachovány rozdílné délky sekvenačních fragmentů obou vláken amplikonu a následně i jejich rozdílné migrační časy při kapilární elektroforeze.

Závěr

Naše studie ukázala, že připojení dlouhého CA adaptéru na 5'-konec sekvenačního primeru umožňuje provedení obousměrné sekvenační reakce pro amplikony genu *TGF β 1* a separaci získaných fragmentů v jediné kapiláře. Překonali jsme tak obecně přijímané dogma, že v sekvenační reakci musí být přítomen pouze jeden typ sekvenačního primeru. Touto metodou jsme potvrdili výsledky fragmentační analýzy, která nezjistila zvýšený výskyt alelické varianty -1552delAGG u žen s pozdními komplikacemi po radioterapii karcinomu děložního čípku. Fluorescence sekvenačních fragmentů byly při obousměrné analýze vyšší než při klasické sekvenační reakci, vyšetření bylo rychlejší a přineslo úsporu značné části vynaložených prostředků.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem Interní grantové agentury MZ ČR č. NT11334-4/2010 a institucionální podporou MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).

LITERATURA

1. Sugarman B. J., Hutchins B. M., McAllister D. L., Lu F., Thomas K. B.: *Bioprocessing J.* 2, 27 (2003).
2. Muller M. C., Cross N. C., Erben P., Schenk T., Hanfstein B., Ernst T., Hehlmann R., Branford S., Saglio G., Hochhaus A.: *Leukemia* 23, 1957 (2009).
3. Sanger F., Coulson A. R.: *J. Mol. Biol.* 94, 441 (1975).
4. Dovichi N. J.: *Electrophoresis* 18, 2393 (1997).
5. Doehring A., Hofmann W. P., Schlecker C., Zeuzem S., Susser S., Geisslinger G., Sarrazin C., Lotsch I. J.: *Antivir. Ther.* 15, 1099 (2010).
6. Sanchez J. J., Borsting C., Hallenberg C., Buchard A., Hernandez A., Morling N.: *Forensic Sci. Int.* 137, 74 (2003).
7. Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M.: *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1 (2012).
8. Richterich P.: *Genome Res.* 8, 251 (1998).

9. De Leeneer K., Hellemans J., De Schrijver J., Baetens M., Poppe B., Van Criekinge W., De Paepe A., Coucke P., Claes K.: *Hum. Mutat.* 32, 344 (2011).
10. Beránek M., Drastíková M., Petera J.: *Chem. Listy* 107, 62 (2013).
11. Healy J., Dionne J., Belanger H., Lariviere M., Beau-lieu P., Labuda D., Sinnott D.: *Int. J. Cancer* 125, 1483 (2009).
12. De Ruyck K., Van Eijkeren M., Claes K., Bacher K., Vral A., De Neve W., Thierens H.: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 65, 1240 (2006).
13. Shah R., Rahaman B., Hurley C. K., Posch P. E.: *Hum. Genet.* 119, 61 (2006).
14. Elliott R. L., Globe G. C.: *J. Clin. Oncol.* 23, 2078 (2005).
15. Grainger D. J., Heathcote K., Chiano M.: *Hum. Mol. Genet.* 8, 93 (1999).
16. Wei Y. S., Zhu Y. H., Du B., Yang Z. H., Liang W. B., Lv M. L., Kuang X. H., Tai S. H., Zhao Y., Zhang L.: *Clin. Chim. Acta* 380, 165 (2007).
17. De Langhe S., De Ruyck K., Ost P., Fonteyne V., Werbrouck J., De Meerleer G., De Neve W., Thierens H.: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 85, 393 (2013).
18. Ewart-Toland A., Chan J. M., Yuan J., Balmain A., Ma J.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 759 (2004).
19. Beránek M., Drastíková M., Buchta V., Kestřánek J., Špaček J., Petera J.: *Chem. Listy* 106, 783 (2012).
20. Beránek M., Drastíková M., Petera J.: *Acta Medica* 55, 160 (2013).
21. Zhou L., Myers A. N., Vandersteen J. G., Wang L., Wittwer C. T.: *Clin. Chem.* 50, 1328 (2004).

M. Beránek^a, M. Drastíková^a, I. Sirák^b, S. Paulíková^b, M. Vošmik^b, and J. Petera^b (^a*Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics*, ^b*Department of Oncology and Radiotherapy, Faculty of Medicine and Faculty Hospital, Hradec Králové*): **Using a Single-Capillary Bidirectional Sequencing for Genotyping the TGFβ1 Gene**

A novel single-capillary method of verification of both-strand analysis of the -1552delAGG genetic polymorphism in the TGF β1 gene is presented. For the verification we used the single-tube sequencing reaction with forward and reverse primers modified at the 5'-end by adapters composed of 55 (forward primer) and 10 (reverse primer) repetitive units of cytosine and adenine (CA adapters). The CA adapters made it possible to get complete readings (of both strands of the amplicons) and to determine different migration times for forward and reverse sequencing fragments in single-capillary electrophoresis. The frequencies of the -1552delAGG variant in experimental (46 women) and control (102 women) groups were 29 % and 33 %, respectively. Our study showed that the attachment of the CA adapters to the primers made it possible to perform sequencing of both strands in one PCR tube as well as to separate forward and reverse sequencing fragments in one capillary.