

Invenția se referă la genetica medicală moleculară, și anume la o metodă de identificare a secvențelor polimorfe 4a/4b ale genei sintetazei endoteliale a oxidului nitric.

În condiții fiziologice oxidul de azot (NO) acționează în calitate de mediator al mai multor funcții biologice, una dintre cele mai importante fiind adaptarea sistemului vascular la necesitățile metabolice intensificate după efortul fizic. Excesul de NO în condiții patologice induce vasodilatarea periferică și sincopă, iar insuficiența oxidului nitric a fost asociată cu astfel de patologii ca hipertensiunea arterială, ateroscleroza și cardiopatia ischemică. Este demonstrat că concentrația de NO în sânge depinde de activitatea enzimei genei sintetazei endoteliale a oxidului nitric (eNOS), aceasta din urmă depinde de polimorfismul genetic ce o codează.

Elaborarea procedurilor inofensive, și totodată eficiente, de diagnosticare și pronosticare genetică a bolilor coronariene cu identificarea polimorfismului genei sintetazei endoteliale de oxid nitric (eNOS) este una dintre problemele actuale în medicina clinică modernă.

Este cunoscut un procedeu de diagnosticare genetică a polimorfismului în intronul 4 al genei care codează sintetaza endotelială a NO, prin reacția de polimerizare în lanț, unde ADN se extrage din sângele periferic al pacienților cu boli cardiovasculare.

Este cunoscut faptul că în intronul 4 al genei eNOS există polimorfismul 4a/4b, care conține 4 sau 5 repetări de 27 pb (perechi de bază). Această substituție facilitează potențialul clivajului enzimei în acest site, diminuând funcționalitatea genei eNOS [1].

Pentru amplificarea porțiunii de ADN, ce conține secvența nucleotidică polimorfă eNOS-4a/4b au fost utilizați primerii sens (s) și antisens (as) cu următoarele secvențe:

1) NOS3 (s) 5'-AGGCCCTATGGTAGTAGTGCCCTTTT-3';

2) NOS3 (as) 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT-3'.

Amplificarea fragmentului ADN, ce conține markerul polimorf minisatelit eNOS-4a/4b, s-a efectuat în 50 μL soluție: Master Mix (echivalent Fermentas) (2x) – 25 μL, primer sens – 1 pM/μL – 5 μL, primer antisens – 1 pM/μL – 5 μL, ADN genomic – 5 ng/μL – 10 μL, H₂O ultrapură – 5 μL.

Compoziția soluției Master Mix este următoarea: soluție pentru executarea PCR (reacției de polimeraze în lanț) care conține MgCl₂ – în concentrație de 2,0 mM – 4,0 μL; deoxinucleozidtrifosfat-5'-trifosfat (dNTP) în concentrație de 0,4 mM – 0,4 μL; Taq polimerază în concentrație de 0,05 unități/μL – 2,0 μL, H₂O ultrapură – 18,6 μL.

PCR s-a realizat cu ajutorul termociclerului Crocodil-III (Appligene S.A, Franța) prin programul automat de amplificare cu regimul următor:

primul ciclu – 94°C/3 min, următoarele 35 cicluri – 94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min, ultimul ciclu – 72°C/6 min. Identificarea alelelor s-a executat după separarea fragmentelor ADN amplificate în gel de agaroză de 2% și s-au colorat cu soluție de bromură de etidiu (0,5 μg/mL). Ampliconul alelei 4a a avut lungimea de 393 perechi de nucleotide (pn), iar cel al alelei 4b – de 420 pn.

Dezavantajele procedurii descrise constau în faptul că este costisitor, totodată:

1) implică izolarea ADN-ului prin utilizarea unor kituri de reactivi costisitori; 2) primerii recomandați formează un număr mare de dimeri în procesul de amplificare; 3) lungimea primerilor NOS3 este mare (25 pb); PCR se efectuează într-un volum de 50 μL de amestec, utilizând astfel o cantitate mare de reagenți chimici, și, de asemenea, de ADN izolat din sângele pacienților. Același program al metodei PCR în termociclu necesită o lungă perioadă de timp – 114 min. Pentru vizualizarea produselor PCR se folosește gelul de agaroză de 2%, ceea ce, de asemenea, prezintă un consum excesiv de reactivi, care pot fi periculoși sănătății investigatorilor în cazul lipsei echipamentelor și tehnicilor speciale de protecție. Toate acestea necesită cheltuieli considerabile și contribuie la tergivesarea analizelor și stabilirea în termen a diagnosticului clinic.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în majorarea eficienței metodei de identificare a secvențelor polimorfe 4a/4b ale genei sintetazei endoteliale a oxidului nitric, precum și în ieftinirea și accelerarea ei.

Esența metodei constă în aceea că se colectează proba integrală de sânge, se extrage ADN cu hidroxid de amoniu 0,7 M, se menține la temperatura camerei timp de 5 min și se incubează într-un termostat la temperatura de 100°C timp de 30 min cu agitare continuă, apoi ADN extras se amplifică cu utilizarea primerilor NOS3 sens: 5'-GCCCTATGGTAGTAGTGCCCTTTT-3' și NOS3 antisens: 5'- CCTCTTAGTGCTGTGGTCA-3', totodată se efectuează denaturarea inițială la temperatura de 94°C timp de 3 min, apoi se efectuează 30 de cicluri cu denaturarea la temperatura de 94°C timp de 1 min, la temperatura de 54°C timp de 30 s, la temperatura de 72°C timp de 30 s și la temperatura de 72°C timp de 5 min, se separă fragmentele amplificate de ADN în gel de agaroză de 1,8%, se colorează cu o soluție de bromură de etidiu de 0,5 μg/mL și se identifică secvențele polimorfe.

Modificarea primerilor a fost concepută în scopul reducerii costului și creșterii eficienței amplificării fragmentelor ADN. Modelarea pentru modificarea primerilor a fost efectuată cu ajutorul soft-ului Oligo Analyzer 3.1. La toate etapele de modelare au fost respectate legile clasice cunoscute de proiectare a primerilor.

Modificarea primerului NOS3 (s) a fost realizată într-o etapă prin deleția nucleotidei AG din capătul 5' și primei nucleotide T din capătul 3':

NOS3 (s) 5'-**AGGCCCTATGGTAGTAGTGCCCTTTT**-3' \iff NOS3_modif_s: 5'-GCCCTATGGTAGTAGTGCCCTT-3'

Modificarea primerului NOS3 (as) a fost realizată în 2 etape. În scopul ameliorării topirii nucleotida T la capătul 5' a fost înlocuită cu nucleotida C. La a doua etapă prima nucleotidă T din capătul 3' a fost eliminată în scopul scurtării lungimii și reducerii costului primerului.

NOS3 (as) 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCA**T**-3' \rightleftharpoons NOS3_modif_as: 5'- CCTCTTAGTGCTGTGGTCA-3'
 Rezultatul invenției constă în ieftinirea metodei date prin utilizarea concentrațiilor mai mici ale componentelor reacției, precum și în accelerarea acesteia prin reducerea ciclurilor de reacție în termociclu pentru PCR, ceea ce o face mai eficientă.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Pentru efectuarea metodei propuse s-au utilizat leucocitele din sângele periferic colectat de la 10 pacienți cu cardiopatie ischemică. În total s-au efectuat câte 10 teste în 3 repetiții pentru analiza eficienței metodei propuse în comparație cu cea mai apropiată soluție.

Prelevarea sângelui venos și separarea leucocitelor din sângele periferic s-a realizat prin metoda standard.

Metoda propusă s-a realizat în felul următor: ADN-ul a fost extras din leucocitele sângelui integral eliberate prin fierbere cu hidroxid de amoniu (MD 3539).

Programul separării ADN: 10 μ L de soluție conținând aproape 10 000 de leucocite s-au amestecat cu 100 μ L de 0,7 M de soluție de hidroxid de amoniu în eprubete de tip Eppendorf și s-au menținut la temperatura camerei timp de 5 min. Apoi eprubetele închise au fost incubate în termostat la temperatura de 100°C agitând continuu timp de 30 min. Concentrația ADN-ului izolat s-a verificat utilizând spectrofotometrul.

ADN extras s-a utilizat pentru amplificarea prin metoda PCR cu utilizarea primerilor NOS3 sens (s) : 5'-GCCCTATGGTAGTAGTGCCTTT-3' și NOS3 antisens (as): 5'- CCTCTTAGTGCTGTGGTCA-3'.

Pentru realizarea reacției s-au utilizat reactivi ai companiei Fermentas Inc. S-au efectuat în paralel 2 experimente testate conform metodei propuse și celei mai apropiate soluții.

Amplificarea ADN-ului s-a efectuat într-un volum de soluție de 25 μ L.

Amestecul de PCR pentru amplificare conține, μ L:

soluție Master Mix	- 12,5,
primer sens cu concentrația de 0,75 pM/ μ L	- 1,25,
primer antisens cu concentrația de 0,75 pM/ μ L	- 1,25,
ADN genomic cu concentrația de 5 ng/ μ L	- 5,
H ₂ O ultrapură	- 5 μ L;
totodată compoziția soluției Master Mix conține, μ L:	
MgCl ₂ cu concentrația de 2,0 mM	- 2,0,
dNTP cu concentrația de 0,4 mM	- 0,2,
Taq polimerază cu concentrația de 0,05 Unități/ μ L	- 1,0,
H ₂ O ultrapură	- 9,3.

Reacția PCR s-a realizat cu ajutorul termociclerului prin programul automat de amplificare cu regimul următor:

primul ciclu - 94°C/3 min, următoarele 30 cicluri - 94°C/1 min, 54°C/30 s, 72°C/30 s, ultimul ciclu - 72°C/5 min. Identificarea alelelor s-a executat după separarea fragmentelor ADN amplificate în gel de agaroză de 1,8% care se colorează cu o soluție de bromură de etidiu (0,5 μ g/mL).

La toți 10 pacienți ampliconul alelei 4a a avut lungimea de 393 pn, iar cel al alelei 4b - de 420 pn.

Paralel, pentru studii de comparație au fost efectuate cercetări în conformitate cu cea mai apropiată soluție.

Eficiența metodei de identificare a secvențelor polimorfe 4a/4b ale genei sintetazei endoteliale a oxidului nitric a fost evaluată prin compararea numărului (%) de produse PCR pozitive cu cea mai apropiată soluție (tab. 1).

Caracteristica comparativă a metodei conform invenției

și metodei conform celei mai apropiate soluții Tabelul 1

Metoda, invenția	Metoda, cea mai apropiată soluție
PCR Master mix	
Volumul final 25 μ L	Volumul final 50 μ L
<ul style="list-style-type: none"> • Master Mix11 - 12,5 μL • primer sens NOS3_modif_s (în concentrație de 0,75 pM/μL) - 1,25 μL • primer antisens NOS3_modif_as (în concentrație de 0,75 pM / μL) - 1,25 μL • H₂O ultrapură - 5 μL • ADN genomic (în concentrație de 5 ng/ μL) - 5 μL 	<ul style="list-style-type: none"> • Master Mix12 - 25 μL • primer sens NOS3 (s) (în concentrație de 1,0 pM/μL) - 5,0 μL • primer antisens NOS3 (as) (în concentrație de 1 pM/μL) - 5,0 μL • H₂O ultrapură - 5 μL • ADN genomic (în concentrație de 5 ng/ μL) - 10 μL
Regimul de amplificare	
<ul style="list-style-type: none"> • primul ciclu - 94°C/3 min • următoarele 30 cicluri - 94°C/1 min, 54°C/30 s, 	<ul style="list-style-type: none"> • primul ciclu - 94°C/3 min • următoarele 35 cicluri - 94°C/1 min, 60°C/1

72°C/30 s	min, 72°C/1 min
• ultimul ciclu – 72°C/5 min	• ultimul ciclu – 72°C/6 min
Vizualizarea produselor PCR în gel de agaroză	
• identificarea alelelor s-a efectuat după separarea fragmentelor ADN amplificate în gel de agaroză de 1,8%, care s-au colorat cu o soluție de bromură de etidiu (0,5 µg/mL)	• identificarea alelelor s-a efectuat după separarea fragmentelor ADN amplificate în gel de agaroză de 2%, care s-au colorat cu o soluție de bromură de etidiu (0,5 µg/mL)
Ampliconul alelei 4a a avut lungimea de 393 pn, iar cel al alelei 4b – de 420 pn.	

La aprecierea rezultatelor reacției, amplificarea pozitivă s-a notat cu punctajul 1, iar cea negativă – cu 0. Datele din tab. 2 demonstrează că rezultatele experimentului sunt absolut identice, prin urmare, metoda solicitată nu numai nu cedează metodei-prototip în eficiență, dar este superioară în ceea ce privește economia financiară și a timpului.

Tabelul 2

Analiza comparativă a rezultatelor amplificării genei de codare a sintetazei endoteliale a oxidului nitric

Nr. amplifi-cării	Rata de succes a reacției PCR, efectuată prin metoda propusă		Rata de succes a reacției PCR, efectuată prin cea mai apropiată metodă	
	Prezența produsului PCR	Absența produsului PCR	Prezența produsului PCR	Absența produsului PCR
I	1	0	1	0
II	1	0	1	0
III	1	0	1	0
IV	1	0	1	0
V	1	0	1	0
VI	1	0	1	0
VII	0	1	0	1
VIII	1	0	1	0
IX	1	0	1	0
X	1	0	1	0
Total	9	1	9	1

Exemplul 2

Pentru testarea primerilor perfecționați în raport cu primerii cunocuți conform cele mai apropiate soluții s-a utilizat soft-ul Oligo Analyzer 3.1 și baza internațională de date genetice GenBank.

A. Comparația primerilor sens: NOS3 (s) 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT-3' și NOS3_modif_s 5'-GCCCTATGGTAGTAGTGCCTTT-3'.

Comparația parametrilor molecular-biologici ai primerilor s-a realizat utilizând datele genetice din baza internațională GenBank prin metoda de analiză BLAST.

Rezultatele demonstrează identitatea ambilor primeri de 100% cu ADN genomic uman și acoperire de 77% (primeri omologi cu secvența de ADN depozitat în baza de date sub numărul AL110203). Astfel, ambii primeri pot fi utilizați în reacția PCR ca primeri sens.

Comparația parametrilor fizici ai ambilor primeri este prezentată în tab 3.

Tabelul 3

Parametrii/primerii	NOS3 (s)	NOS3_modif_s
Lungimea primerului, bp	25	22
Temperatura de topire	59,6°C	56,4°C
Mărimea coeficientului termodinamic al structurii stabile secundare	-1,37°C	-0,22°C
Cantitatea de dimeri	13	12

Comparația parametrilor primerilor relevă lungimea mai scurtă a primerului NOS3_modif_s în raport cu NOS3 (s). Astfel, sinteza primerului perfecționat cu lungimea mai scurtă cu 3 nucleotide prin metoda propusă permite o economie financiară. Un punct de topire mai jos comparativ cu originalul economisește cheltuielile de energie necesară în reacție. Primerul perfecționat are un număr mai mic de dimeri, precum și structuri secundare instabile, reducând numărul de amplificări non-specifice în timpul PCR.

B. Comparația primerilor antisens: NOS3 (as) 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT-3' și NOS3_modif_as: 5'-CCTCTTAGTGCTGTGGTCA-3'

Rezultatele demonstrează identitatea de 100% a ambilor primeri NOS3 (as) și NOS3_modif_as cu ADN genomic uman, ce codifică intronul 4 al genei NOS3, și acoperirea de 95...100% (primeri omologi cu secvența de ADN

depozitată în baza de date sub numărul NOS3). Astfel, ambii primeri pot fi utilizați în reacția PCR ca primeri antisens. În plus, primerul perfecționat are afinitate cu 5% mai mare pentru intronul 4 al genei NOS3.

Comparația parametrilor fizici ai ambilor primeri este prezentată în tab 4.

Tabelul 4

Parametrii/primerii	NOS3 (as)	NOS3_modif_as
Lungimea primerului, bp	20	19
Temperatura de topire	53,1°C	54,0°C
Mărimea coeficientului termodinamic al structurii stabile secundare	+1,44°C	+0,8°C
Cantitatea de dimeri	9	9

Comparația parametrilor primerilor relevă dimensiunea mai mare a primerului NOS3_modif_as în raport cu NOS3 (as). Astfel, sinteza primerului perfecționat cu lungimea mai scurtă cu o nucleotidă permite o economie financiară. Primerul perfecționat are structuri secundare mai instabile, ce reduce numărul de amplificări non-specifice în PCR.

C. Modelarea PCR cu utilizarea perechilor de primeri modificați NOS3_modif_s / NOS3_modif_as și primerii-cunosuți NOS3 (s) / NOS3 (as).

Conform regulilor cunoscute pentru PCR, diferența dintre temperaturile de topire a primerilor sens-antisens trebuie să fie minimă. Astfel, primerii modificați satisfac cel mai bine această cerință. Perechea de primeri modificați necesită o temperatură de topire mai mică, economisind costurile energetice la încălzirea amplificatorului (tab. 5).

Considerând că dimensiunea produselor de amplificare presupuse va fi de 420 pb, în corespundere cu regulile generale de amplificare, timpul topirii și elongării poate fi scurtat, ceea ce va reduce durata reacției.

Tabelul 5

Parametrii/primerii	NOS3 (s) / NOS3 (as)	NOS3_modif_s / NOS3_modif_as
Diferența dintre temperaturile de topire a primerilor	6,5°C (59,6°C - 53,1°C)	2,4°C (56,4°C - 54,0°C)
Temperatura de topire a primerilor	60°C	54°C
Modelarea programului de amplificare PCR	primul ciclu – 94°C/3 min, următoarele 35 cicluri – 94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min, ultimul ciclu – 72°C / 6 min.	primul ciclu – 94°C/3 min, următoarele 30 cicluri – 94°C/1 min, 54°C/30 s, 72°C/30 s, ultimul ciclu – 72°C/5 min.

Astfel, metoda de identificare a secvențelor polimorfe 4a/4b ale genei sintetazei endoteliale a oxidului nitric este mai eficientă, mai ieftină și de o durată mai scurtă.