

MULTIPLEXNÍ DIDEOXYNUKLEOTIDOVÉ SEKVENOVÁNÍ S POLYADENYLOVANÝMI SEKVENAČNÍMI PRIMERY

MARTIN BERÁNEK^a, MONIKA DRASTÍKOVÁ^a
a JIŘÍ PETERA^b

^a Ústav klinické biochemie a diagnostiky a ^b Onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové
beranek@lfhk.cuni.cz

Došlo 3.9.12, přijato 27.9.12.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: DNA, multiplex, sekvenování, PCR, gen HFE, polyadenylovaný primer

Úvod

Polyadenylace je fyziologický proces, který slouží k uvolnění molekul mRNA z buněčného jádra do cytoplazmy a k jejich správnému umístění v ribosomu. Připojení několika set adenosinových zbytků na 3' konec pre-mRNA katalyzuje v buňce polynukleotidaadenylyltransferasa (poly(A) polymerasa, EC 2.7.7.19, cit.¹). Polyadenylaci lze tímto způsobem provést i v laboratorních podmínkách².

Na rozdíl od molekul mRNA, polyadenylace DNA se provádí pouze *in vitro*. Polyadenylační chvost, dále poly(A) chvost, připojený na 3' konec „tupých“ (blunt) konců produktů polymerasové řetězové reakce (PCR) zvyšuje účinnost klonování do TA klonovacích vektorů (pDrive, Topo TA, pTZ57R, pLUG, apod.). Modifikace signálních řetězců pomocí poly(A) chvostu je základem metody amplifikace DNA vytěšňováním řetězce (strand displacement assay – SDA)³, je využívána při mikročipové analýze⁴ a při hybridizaci ampliconů k pevnému podkladu (sekvenační systém HeliScope, Helicos, USA).

Polyadenylaci 3' konce nukleových kyselin lze provést účinkem poly(A) polymerasy² nebo pomocí terminální deoxyribonukleotidytransferasy (EC 2.7.7.31) a polynukleotidfosforylasy (EC 2.7.7.8)³. K dalším možnostem adenylace patří připojení hotového poly(A) chvostu k 3' konci DNA ligasou (EC 6.5.1.1) nebo přímá chemická syntéza adenylovaných polynukleotidových řetězců s délkou od desítek (oligomery) do dvou set nukleotidů (ultramery)^{5–7}. Posledně zmíněný postup umožňuje adenylovat jak 3' konce, tak 5' konce DNA molekul.

V naší předešlé práci jsme se zabývali vlastnostmi sekvenačních primerů modifikovaných na 5' konci poly(A) chvostem při dideoxynukleotidovém sekvenování⁸. Kromě významného zlepšení čitelnosti krátkých ampliconů jsme při kapilární elektroforéze zaznamenali také prodloužení

migračního času adenylovaných sekvenačních produktů, které bylo úměrné délce poly(A) chvostu. Z tohoto poznatku jsme vyvodili hypotézu, že při dostatečně dlouhém chvostu by při dideoxynukleotidovém sekvenování bylo možno pracovat v multiplexním uspořádání, aniž by vzájemně interferovaly elektroforetické záznamy pro jednotlivé typy ampliconů. K potvrzení naší hypotézy jsme tímto postupem analyzovali lidský gen *HFE* (lokalizace 6p21.3). V tomto genu se nachází několik populačně rozšířených mutací podmiňujících fenotypové projevy vrozené hemochromatózy. Nejdůležitější z nich jsou mutace H63D (rs179945, transverze c.187C>G) a S65C (rs1800730, transverze c.193A>T) v exonu 2 a mutace C282Y (rs1800562, transverze c.845G>A) v exonu 4. Cílem naší práce bylo provést u série vzorků DNA multiplexní PCR, purifikaci získaných ampliconů, multiplexní sekvenační reakci, separaci získaných fragmentů kapilární elektroforézou, a poté určit přítomné genotypy *HFE* genu.

Experimentální část

Charakteristika vyšetřovaných vzorků

V experimentu bylo použito 40 vzorků DNA získaných od pacientů s podezřením na vrozenou formu hemochromatózy (medián věku 39 roků, rozmezí 18–69 roků) se známým genotypem *HFE* genu. Toto vyšetření proběhlo v rámci diagnostického procesu analýzou restričních fragmentů (PCR-RFLP)⁹. DNA byla izolována pomocí komerčních mikrokolonek (QIAamp Blood Mini Kit, Qiagen, SRN).

Multiplexní polymerasová řetězová reakce

Amplifikační směs pro PCR (objem 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), amplifikační primery pro exony 2 a 4 genu *HFE* (Takara) a 50 ng DNA. Amplifikační primery pokrývající oblast mutací H63D a S65C v exonu 2 měly následující složení: přímý (forward) primer: 5'-ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC-3', reverzní primer: 5'-GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT-3'; primery pro identifikaci mutace C282Y v exonu 4 byly: přímý primer: 5'-CTG GAT AAC CTT GGC TGT ACC CCC-3', reverzní primer: 5'-CAG ATC CTC ATC TCA CTG-3'. Teplotní podmínky PCR v termocykléru ABI 2720 (Applied Biosystems, USA) zahrnovaly iniciační denaturaci 5 min při 95 °C a 30 amplifikačních cyklů (denaturace 30 s při 95 °C, hybridizace 30 s při 57 °C, elongace 30 s při 72 °C). Úspěšnost amplifikace PCR produktů pro exon 2 (208 bp) a exon 4 (189 bp) byla kontrolována na 3% agarosovém gelu s ethidiumbromidem (100 V, 90 min). Poté byly amplicony obsažené v reakční směsi purifikovány soupravou „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) a použity pro sekvenování.

Multiplexní dideoxynukleotidové sekvenování s adenylovanými primery

Sekvenační reakce (20 μ l) obsahovala 8 μ l komerční reakční směsi s pufrem a optimalizovaným množstvím chloridu hořečnatého, deoxynukleotidů, dideoxynukleotidů a termostabilní DNA polymerasy („BigDye X Terminator Kit“ verze 3.1, Applied Biosystems), dále 5 μ l směsi obou purifikovaných amplikonů a sekvenační primery pro oba exony ve finální koncentraci 500 nmol l⁻¹. K sekvenační reakci v exonu 2 byl použit hyperadenylovaný reverzní primer 5'- (polyA)₁₀₅ -GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT-3' (IDT, USA). Pro exon 4 byl navržen adenylovaný reverzní primer 5'- (polyA)₂₀ -CAC ATA CCC CAG ATC ACA AT-3' (Generi Biotech, ČR) nasedající na vnitřní část amplikonu. Reakce začínala minutovou denaturací při 96 °C, po které následovalo 35 amplifikačních cyklů (denaturace 20 s při 96 °C, hybridizace 20 s při 50 °C a elongace 4 min při 60 °C). Produkty reakce byly přečištěny gelovou filtrací (souprava „BigDye X Terminator Purification Kit“, Applied Biosystems) dle pokynů výrobce. Délky získaných fragmentů zakončených dideoxynukleotidy byly vzhledem k rozdílné velikosti poly(A) chvostů obou primerů 41–124 nukleotidů pro exon 4 a 126–314 nukleotidů pro exon 2 genu *HFE*. Do výpočtu byly kromě délek poly(A) chvostů zahrnuty také délky sekvenačních primerů, sekvenovaných úseků amplikonů a přičten jeden nukleotid s adeninem přidávaný na 3' konec amplikonů terminální transferasovou aktivitou *Taq* polymerasy. Elektroforetické podmínky při sekvenování byly: délka kapiláry 36 cm, polymer POP7 (obě položky Applied Biosystems), elektrokinetický nástřik vzorků 8 s při 1,2 kV; separace fragmentů 30 min při 8,5 kV a teplotě 60 °C. Hodnocení sekvencí bylo provedeno v programu Sequencing Analysis Software, verze 5.3.1. (Applied Biosystems).

Pro značení genotypů *HFE* genu jsme použili zkratky C, H a S podle přítomného typu mutace (C282Y, H63D nebo S65C); jako wt (wild-type) byla označena nemutovaná alela genu *HFE*. Celkový počet možných genotypů byl deset (homozygotní genotypy C/C, H/H, S/S a wt/wt; heterozygotní formy C/wt, H/wt a S/wt a smíšené heterozygotní formy C/H, C/S a H/S). Výskyt mutací v genu *HFE* ve vzájemné pozici *cis* (tedy obě na toméž chromosomu) je raritním jevem¹⁰ a nebyl proto v naší studii předpokládán.

Výsledky

Horizontální elektroforézou jsme potvrdili amplifikaci PCR produktů obou exonů genu *HFE* ve všech 40 vzorcích. Intenzita obou typů amplikonů (189 bp a 208 bp) na 3% agarosovém gelu byla přibližně stejná. Následná sekvenační analýza identifikovala ve vyšetřovaném souboru přítomnost dvou postižených homozygotů C/C (5 %), jednoho homozygota H/H (2,5 %), dvou smíšených heterozygotů C/H (5 %), jednoho smíšeného heterozygota H/S (2,5 %), čtyř heterozygotů C/wt (10 %), 15 heterozygotů H/wt (37,5 %) a 15 homozygotů wt/wt

(37,5 %). Riziko fenotypových projevů vrozené hemochromatózy bylo prokázáno u 6 osob (15 %). Frekvence jednotlivých alel v souboru byly 0,62 pro alelu wt, 0,25 pro alelu H, 0,12 pro alelu C a 0,01 pro alelu S. Určené genotypy byly v souladu s výsledky analýzy PCR-RFLP.

Diskuse

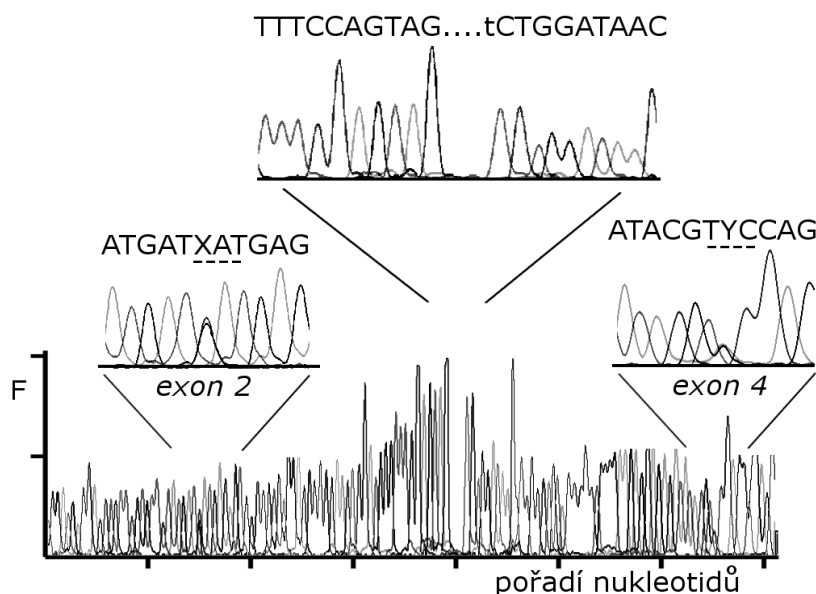
Vrozená hemochromatóza patří v Evropě mezi nejfrekvencovanější geneticky podmíněné choroby s autosomálně recesivním přenosem. Populační studie ukázaly, že každý patnáctý obyvatel ČR je nositelem mutace C282Y, která je považována z hlediska hemochromatózy za mutaci nejrizikovější¹¹. Nicméně projevy hemochromatózy mohou podmiňovat i obě další zmíněné mutace. Současným trendem v diagnostice mutací v genu *HFE* jsou multiplexní reakce založené na principu extenze primerů¹² nebo analýzy teploty tání s použitím interkalčních látek¹³. Sekvenování příslušných exonů genu *HFE* je u těchto přístupů považováno za metodu konfirmační.

Naše práce ukázala, že díky polyadenylačním chvostům připojeným na 5' konec sekvenačních primerů lze také proces dideoxynukleotidového sekvenování zefektivnit do multiplexního uspořádání. Informaci o přítomnosti mutací C282Y, H63D a S65C tak lze získat z jediné analýzy. Navržený multiplexní, resp. duplexní charakter vyšetření obou exonů je vzhledem k nízkému výskytu (hluboko pod 0,1 %) dalších typů mutací v genu *HFE* (G168T, G169A, G93R, I105T, atd.)¹⁴ dostatečný.

Dideoxynukleotidové sekvenování v multiplexním uspořádání založené na použití ultramerů prodlužujících při kapilární elektroforéze čas migrace jednoho z amplikonů je svým provedením unikátní. Naše řešení týkající se zejména kratších amplikonů (do 200 bp) pracuje se čtyřmi standardními typy značených dideoxynukleotidů. Nebylo nutné přidávat jakékoliv další fluorofory s odlišnými emisními maximy (což může být problém zejména u přístrojů s argonovým laserem), validovat nové směsi deoxynukleotidů a dideoxynukleotidů, definovat nové matrice pro optickou kalibraci systému ani nijak upravovat používané vyhodnocovací algoritmy. Cena ultrameru byla vzhledem k ceně ostatních sekvenačních reagentů zanedbatelná a odpovídala asi trojnásobku ceny běžného primeru.

Délka ultrameru pro dideoxynukleotidové sekvenování by měla být maximálně 125 nukleotidů, včetně specifické sekvence vlastního primeru. Delší ultramery (testovali jsme ultramery o délce 135 a 145 nukleotidů) vykazovaly nízkou efektivitu sekvenační reakce, získané fragmenty byly při kapilární elektroforéze méně uniformní a vyšetření bylo zatíženo větší nejistotou při interpretaci získaných dat.

Jak je patrné z experimentální části práce, krátkým polyadenylačním chvostem jsme opatřili také sekvenační primer navržený pro exon 4. Jeho připojením jsme dosáhli vyšší čitelnosti nukleotidů v oblasti nejkratších produktů sekvenační reakce, jak jsme popsali již dříve⁸, aniž by došlo k výraznému posunu migračního času těchto amplikonů.



Obr. 1. Elektroforeogram získaný při multiplexním sekvenování s polyadenylovanými primery v exonech 2 a 4 genu *HFE*. Kodony s identifikovanou mutací jsou podtrženy přerušovanou čarou

Dolní část obr. 1 ukazuje podstatnou část elektroforeogramu získaného sekvenováním obou exonů v multiplexním uspořádání. Příslušné oblasti exonů 2 a 4 s označenými místy mutací jsou znázorněny v levé a pravé horní části obrázku. Střední horní část obrázku prezentuje oblast elektroforeogramu, kde končí sekvence exonu 2 a navazuje oblast exonu 4 s patrnou (a předpokládanou, viz experimentální část práce) dvounukleotidovou mezerou. Vzhledem k tomu, že pro oba exony byly použity reverzní sekvenační primery, byly z interpretačních důvodů sekvence softwarově konvertovány na komplementární přímá (forward) vlákna. Důsledkem je: a) umístění sekvence exonu 2 v levé části elektroforeogramu, přestože zde byl použit hyperadenylovaný sekvenační primer, b) přítomnost prvního nukleotidu ampliconu exonu 4 označeného na obr. 1 jako „t“ dokládající terminální transferasovou aktivitu použité *Taq* polymerasy při syntéze reverzního vlákna. Genotyp pacienta demonstrováného na obr. 1 byl: C/H, tedy smíšený heterozygot pro mutace C282Y (na obrázku označeno podtrženým písmenem Y) a H63D (podtržené písmeno X) s rizikem vrozené hemochromatózy.

Závěr

Polyadenylace sekvenačních primerů umožnila v naší studii provést dideoxynukleotidové sekvenování exonů 2 a 4 genu *HFE* v multiplexním uspořádání. Na základě tohoto přístupu jsme byli schopni u 40 vzorků DNA vždy z jediného nástřiku identifikovat tři nejčastější mutace (C282Y, H63D a S65C) v tomto genu související

s výskytem vrozené hemochromatózy v České republice. Ve studovaném souboru pacientů s podezřením na vrozenou formu hemochromatózy jsme prokázali rizikový genotyp *HFE* genu u šesti osob.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem Interní grantové agentury MZ ČR č. NT11334-4/2010.

LITERATURA

1. Calvo O., Manley J. L.: *Genes Dev.* 17, 1321 (2003).
2. Bernstein P., Peltz S. W., Ross J.: *Mol. Cell. Biol.* 9, 659 (1989).
3. Vary C. P. H., McMahon F. J., Barbone F. P., Diamond S. E.: *Clin. Chem.* 32, 1696 (1986).
4. Smith L. K., Gomez M. J., Shatalin K. Y., Lee H., Neyfakh A. A.: *Genome Biol.* 8, R87 (2007).
5. Dower K., Kuperwasser N., Merrih H., Rosbash M.: *RNA* 10, 1888 (2004).
6. Gibson D. G.: *Nucleic Acids Res.* 37, 6984 (2009).
7. Yang G., Wang S., Wei H., Ping J., Liu J., Xu L., Zhang W.: *Biotechnol. Lett.* 34, 721 (2012).
8. Beránek M., Drastíková M., Buchta V., Kestřánek J., Špaček J., Petera J.: *Chem. Listy* 106, 783 (2012).
9. Drastíková M., Beránek M., Hegerová J., Putzová D.: *Čas. Lék. Čes.* 151, 431 (2012).
10. Spriggs E. L., Harris P. E., Best L. G.: *Am. J. Hum. Genet.* 65, A492 (1999).
11. Čimburová M., Půtová I., Provazníková H., Pintérová, D., Horák J.: *Folia Biol.* 51, 172 (2005).

12. Cardoso S. P., Patel R., Brown C., Navarrete C.: *Tissue Antigens* 78, 171 (2011).
13. Santos P. C., Soares R. A., Krieger J. E., Guerra-Shinohara E. M., Pereira A. C.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 1633 (2011).
14. Lyon E., Frank E. L.: *Clin. Chem.* 47, 71147 (2001).

M. Beránek^a, M. Drastíková^a, and J. Petera^b

^a*Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics,*

^b*Department of Oncology, Faculty of Medicine and Faculty Hospital, Hradec Králové):* **Multiplex Dideoxynucleotide Sequencing Using Polyadenylated Sequencing Primers**

The title method is applied to one of the analyzed amplicons. The new approach is used for identification of C282Y (C), H63D (H), and S65C (S) mutations in the

HFE gene. In a group of DNA samples from 40 patients with suspected hereditary hemochromatosis we amplified specific parts of *HFE* exon 2 (208 bp) and exon 4 (189 bp) by multiplex PCR. Purified amplicons were subsequently used in a multiplex cycle sequencing reaction containing a hyperadenylated reverse primer for exon 2. Adenylation with a 105-nucleotide polyadenylated tail attached to the 5' end of the primer significantly prolonged the migration time of the exon 2 amplicons in the electrophoretic capillary. This enabled us to obtain separated sequencing data for both the studied amplicons. The numbers of identified zygotes and allelic frequencies in the patients are given. We found six subjects with the risk of hereditary hemochromatosis (15 %). The new method is a faster and cheap alternative to dideoxynucleotide sequencing using standard sequencing primers. Hyperadenylation makes it possible to obtain complete information about the presence or absence of C282Y, H63D and S65C mutations in the *HFE* gene from one-capillary electrophoretic analysis.