ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 577.218
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-1-48-60

Поступила в редакцию 15.12.2020
Received 15.12.2020

И. В. Гайдукевич, А. М. Горькавая, А. В. Грудо, Г. В. Сергеев, С. А. Усанов

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Аннотация. Разработана мультиплексная система для определения мутаций в локусах rs5985, rs1799983, rs5918, rs2243093, rs4673, rs4646994, rs1722009, rs3980933, rs71103505, ассоциированных с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Данные мутации относятся к различным типам – SNP, STR, Ins/Del – поэтому для их определения использованы технологии минисеквенирования и фрагментного анализа. Проведен анализ олигонуклеотидов для амплификации всех локусов в формате одной реакции. Технология минисеквенирования по сравнению с фрагментным анализом потребовала дополнительных этапов пробоподготовки, в связи с чем олигонуклеотиды для локусов с SNP были объединены в отдельный плекс. Для двух созданных плексов оптимизированы одинаковые состав амплификационной смеси и параметры программы ПЦР реакции, разработаны панели «бинов» для интерпретации результатов. Апробация системы подтвердила возможность определения мутаций в девяти локусах с высокой чувствительностью и воспроизводимостью.

Ключевые слова: фрагментный анализ, минисеквенирование, SNP, сердечно-сосудистые заболевания

Для цитирования. Разработка мультиплексной системы для определения маркеров предрасположенности к развитию сердечно-сосудистых заболеваний / И. В. Гадукевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 1. С. 48–60. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-1-48-60

I. V. Haidukevich, A. M. Gorkavaya, A. V. Grudo, G. V. Sergeev, S. A. Usanov

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

DEVELOPMENT OF THE MULTIPLEX SYSTEM FOR DETERMINING MARKERS OF PREDISPOSITION TO CARDIOVASCULAR DISEASES

Abstract. A multiplex system to detect mutations at loci rs5985, rs1799983, rs5918, rs2243093, rs4673, rs4646994, rs1722009, rs3980933, rs71103505 associated with the development of cardiovascular diseases has been developed. These mutations belong to different types – SNP, STR, Ins/Del – therefore, minisequencing and fragment analysis technologies were used to determine them. Oligonucleotide analysis was performed to amplify all loci in a single reaction format. The minisequencing technology, in comparison with fragment analysis, required additional stages of sample preparation; therefore, oligonucleotides for loci with SNP were combined into a separate plex. For the two plexes created, the same composition of the amplification mixture and parameters of the PCR reaction program were optimized, and "bin" panels were developed to interpret the results. The testing of the system confirmed the possibility of detecting mutations at nine loci with high sensitivity and reproducibility.

Keywords: fragment analysis, minisequencing, SNP, cardiovascular disease

For citation. Haidukevich I. V., Gorkavaya A. M., Grudo A. V., Sergeev G. V., Usanov S. A. Development of the multiplex system for determining markers of predisposition to cardiovascular diseases // *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceeding of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series,* 2021, vol. 57, no. 1, pp. 48–60 (In Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-1-48-60

Введение. Индивидуальный подход к каждому пациенту значительно улучшает эффективность процесса лечения и ускоряет выздоровление. Этот принцип лег в основу персонализированной медицины, где, помимо общепринятых данных о пациенте (возраст, индекс массы тела, биохимические показатели, данные УЗИ исследований, томографии и т.д.), используют информацию о его генотипе. Первоначально персонализированная медицина применялась при лечении

редких заболеваний, где одна мутация коррелирует с развитием определенной патологии. Дальнейшее развитие персонализированной медицины распространилось на лечение тех заболеваний, у которых отсутствовала прямая связь мутация–болезнь. К подобным заболеваниям относятся нарушения сердечно-сосудистой системы, когда определенные мутации не вызывают заболевание напрямую, а имеют аддитивный эффект, т.е. привносят свой вклад, например, в развитие ишемической болезни сердца. При обнаружении множества мутаций у пациента раньше стоял вопрос о степени риска, который вносит каждая из мутаций в развитие заболевания. В решении данной проблемы сейчас помогают обширные базы данных по обнаруженным мутациям у пациентов с теми или иными заболеваниями [1].

Для выявления мутаций генов в геноме человека могут использоваться различные методические подходы. Изначально применялись методы разделения аллелей, основанные на физико-химических свойствах нуклеиновых кислот: разделение гомо- и гетеродуплексов методом гель электрофореза (в нативных, в денатурирующих условиях, с использованием градиента и/или интеркалирующих красителей) [2, 3], выявление гетеродуплексов с помощью специфических ферментов (Cleavase I, MutS белка, T4 эндонуклеазы VII) [4–6], разделение по массе с помощью методов масс-спектрометрии [7]. Однако все перечисленные подходы не позволяют определить мутацию напрямую, на основе нуклеотидной последовательности. С развитием генотипирования «золотым стандартом» стало секвенирование ДНК, начиная с секвенирования по Сэнгеру и продолжая методами NGS. Наряду с этим было создано большое количество методов обнаружения SNP, применяемых в лабораториях и основанных на различных техниках (аллель специфической гибридизации, элонгации праймеров, лигирования, инвазивного ращепления (Invasive Cleavage)) в комбинации с множеством способов детекции (люминисценции, флуоресценции, флуоресцентной поляризации, FRET, масс спектрометрии) [8–10].

При создании системы, позволяющей определять девять мутаций (табл. 1), ассоциированных с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, мы ориентировались на современные методы диагностики, воспроизводимость результатов и их точность, возможности упрощения процедуры пробоподготовки и анализа результатов.

Таблица 1. **Мутации, определяемые с помощью разработанной диагностической системы**

Table 1. **Mutations determined using the developed diagnostic system**

Обозначение SNP	Корреляция с заболеванием	Источник
Rs5985	Венозная тромбоэмболия	[11]
Rs1799983	Ишемическая болезнь сердца	[12]
Rs5918	Ишемическая болезнь сердца	[13]
Rs2243093	Ишемия мозга	[14]
Rs4673	Ишемическая болезнь сердца	[15]
Rs3980933	Семейная гиперхолестеринемия	[16]
Rs4646994 (альтернативное обозначение rs1799752)	Гипертония, васкулит	[17]
Rs1722009	Эктазия коронарной артерии	[18]
rs71103505 (альтернативное обозначение rs5810761)	Гипертония	[19]

Материалы и методы. Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе, были произведены компаниями «Праймтех», Республика Беларусь или «Синтол», РФ. В состав 10-кратной смеси для амплификации входили 600 мМ Трис-HCI (pH 9,0), 170 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % Твин 20, 15 мМ $MgCI_2$, 2 мМ смесь dNTP. В работе использовалась Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, 0,2 ед./25 мкл ПЦР смеси).

Программа амплификации состояла из последовательных этапов: 1) денатурация (95 ºС, 5 мин, 1 цикл); 2) элонгация (95 ºС, 30 с; 68 ºС) или градиент температуры (30 с; 72 ºС 30 с, 30 циклов); 3) заключительная элонгация (72 ºС, 5 мин, 1 цикл); 4) хранение при 4 ºС. ПЦР реакцию проводили на амплификаторе T100 (Bio-Rad, США). Разделение продуктов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном геле с использованием ТАЕ буфера в присутствии 0,5 мкг/мл бромистого

этидия при условиях электрического поля 0,7 В/см^2. ДНК из агарозного геля выделяли с использованием набора Nucleospin Gel and PCR Clean-up («Macherey-Nagel», Германия) согласно инструкции производителя.

Выделение геномной ДНК из образцов слюны осуществляли с помощью набора «Набор ДНК-ВК, ТУ BY 100185129.154-2016» (ИБОХ, Беларусь). Концентрации образцов ДНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo scientific», США).

Для постановки фрагментного анализа в расчете на одну лунку 96-луночного планшета добавляли по 9,0 мкл Hi-Di формамида, 0,5 мкл размерного стандарта GeneScan-500 LIZ Size Std Kit, 0,5 мкл продукта ПЦР, далее проводили тепловую денатурацию – 95 ºС 5 мин с последующим охлаждением до 10 ºС. Планшет помещали в генетический анализатор и запускали протокол проведения фрагментного анализа для используемого диапазона лунок.

Постановку реакции секвенирования осуществляли используя набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Очистку сиквенс-продуктов проводили с использованием набора Applied Biosystems BigDye XTerminator Purification Kit. Анализ продуктов секвенирования проводили на приборе Hitachi 3130 Genetic Analyzer (POP7 полимер, длина капилляра в приборе – 36 см).

Для постановки реакции минисеквенирования 5 мкл реакционной смеси после амплификации смешивали с 10 ед. нуклеазы ExoI («NEB», США) и 1,0 ед. фосфатазы rSAP («NEB», США). Смесь инкубировали 37 ºС, 60 мин с последующей инактивацией при 75 ºС, 15 мин. Смесь охлаждали и разводили в десять раз деионизованной водой. 1,5 мкл смеси использовали для постановки реакции минисеквенирования, применяя набор SNaPshot Multiplex Kit («Thermo Fisher», США). После проведения реакции смесь обрабатывали 1,0 ед. фосфатазы rSAP («NEB», США) при 37 ºС, 60 мин с последующей инактивацией при 75 ºС, 15 мин. Для анализа продуктов минисеквенирования в расчете на одну лунку 96-луночного планшета добавляли по 9,25 мкл Hi-Di формамида, 0,25 мкл размерного стандарта GeneScan LIZ120 Size Std Kit, 0,5 мкл продукта минисеквенирования. Проводили тепловую денатурацию – 95 ºС, 5 мин с последующим охлаждением до 10 ºС. Планшет помещали в генетический анализатор и запускали протокол проведения фрагментного анализа с учетом типа размерного стандарта для используемого диапазона лунок. Для создания панелей «бинов» и анализа результатов фрагментного анализа и минисеквенирования использовали программу «GeneMapper® 4.0» («Thermo scientific», США).

Результаты исследований и их обсуждение

Конструирование праймеров для амплификации. При подборе праймеров для амплификации анализировалась область длиной около 600 п.н., содержащая в середине последовательности искомую мутацию. Анализ проводили с использованием базы данных NCBI – для идентификации целевой мутации, анализа близлежащей области на наличие мутаций, препятствующих отжигу праймеров. Дизайн праймеров осуществлялся с помощью программы Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen). Основные критерии при поиске праймеров были следующие: T_m = 58–62 °С; GC = 35–65 %; длина праймера 20–30 нукл.; длина продукта 160–270 п.н.; различие T_m в паре праймеров <= 3 °С; различие по количеству GC в паре праймеров <=10 %; минимально возможное количество шпилек и точек образования праймер димеров; энергия (dG) разрыва (свободная энергия Гиббса) вторичных структур не ниже – 2 ккал/моль. Для каждой ДНК мишени анализировали не менее 50 пар праймеров. Только две пары праймеров были взяты из литературных источников: для определения мутаций rs4646994 (ACE) [20] и rs71103505 (BDKRB2) [21]. В качестве дополнительных была разработана вторая пара праймеров: (144) для LDLR локуса и второй прямой праймер (F2) для локуса rs4673 (табл. 2).

Отобранные пары праймеров разделялись на две смеси согласно типу анализа, с помощью которого планировалось определять анализируемые мутации: 1) мутации: rs3980933 (LDLR), rs4646994 (ACE), rs61722009 (eNOSab) и rs71103505 (BDKRB2) (определение с помощью фрагментного анализа); 2) мутации: rs5985, rs1799883, rs5918, rs2243093 и rs4673 (определение методом минисеквенирования). Внутри каждой смеси все праймеры анализировались попарно друг с другом

на наличие праймер-димеров (программа Vector NTI Advance 11.0, расчет энергии разрыва (dG) димеров проводился для температуры 60 °С). Температура 60 °С была выбрана в качестве расчетной температуры отжига, поэтому именно при этой температуре проводили анализ возможности разрыва праймер-димеров в смесях. На основании литературных данных [22], энергия разрыва праймер-димеров должна лежать в диапазоне от –3 до 3 ккал/моль. Увеличение отрицательных значений dG до –6, особенно в 3'-областях праймеров, приводит к невозможности разрыва праймер-димеров, нарушению амплификации ПЦР продуктов и требует разработки новых праймеров. Согласно табл. 3, конфликт в работе праймеров может наблюдаться в парах LDLR177R/BDKRB2R, LDLR144R/ACE_R, ACE_R/ACE_R при постановке мультиплексных реакций.

Таблица 2. **Последовательности праймеров, использованных при разработке диагностической системы**

Table 2. **Sequences of primers used in the development of the diagnostic system**

Маркер	Обозначение праймера	Последовательность	Длина ампликона, п.н.
rs3980933 (LDLR)	LDLR177F	(FAM) GAACCGTGATAAGCCTTTCTGG	177
	LDLR177R	ATACAGCAACCAGGGTTTGC	
	LDLR144F	(FAM) GGGGATTTTTTGTTATGTTTGC	144
	LDLR144R	GGCCCCGAGAATAGTCACTG	
rs4646994 (ACE)	ACE_F	(TAMRA) CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT	Вставка 479 / делеция 192
	ACE_R	CGTGGCCATCACATTCGTCAGAT	
rs61722009 (eNOSab)	eNOSab#30_F	(FAM) TCAGCACCCAGGGGAACCTC	Вставка 281 / делеция254
	eNOSab#30_R	GCTTTTCCAGGAGGCTGCTCC	
rs71103505 (BDKRB2)	BDKRB2F	(FAM) TCTGGCTTCTGGGCTCCGAG	Вставка 100 / делеция 91
	BDKRB2R	AGCGGCATGGGCACTTCAGT	
RS5985	RS5985F	GGAACCCCAGTGGAGACAGAGG	203
	RS5985R	AGGCAGAAGAGCAGTTCCACCC	
RS1799983	RS1799983F	GGAGATGAAGGCAGGAGACAGTGG	197
	RS1799983R	TCGGGGGGCAGAAGGAAGAG	
RS5918	RS5918F	GTAGAGAGTCGCCATAGCTCTGATTGCTGG	269
	RS5918R	AGAGTCCCAGCCCTACCTGGCCGG	
RS2243093	RS2243093F	CTGAGGGAGGGGAAAGAGCCAAGG	360
	RS2243093R	GAGGATGGTTGTGTCTTTCGGCAGGTC	
RS4673	RS4673F	TGCACACTAGACAGCAGACACAGGCCC	337 215
	RS4673F2	AGGGTCGGCTCCAAGCCCTCCTG	
	RS4673R	GTGGTCAGCAGGGCAGCAAAGGAG	

Таблица 3. **Диапазон значений свободной энергии Гиббса для разрыва вторичных структур при попарном сравнении праймеров для плекса 1 и плекса 2**

Table 3. **Range of Gibbs free energy values for breaking secondary structures in pairwise comparison of primers for plex 1 and plex 2**

Плекс 1	LDLR177F	LDLR177R	LDLR144F	LDLR144R	ACE_F	ACE_R	eNOSab#30_F	eNOSab#30_R	BDKRB2F	BDKRB2R
LDLR177F	3,3/3,4	1,0/2,4	–	–	1,7/3,6	1,1/3,1	1,0/3,1	–0,3/3,1	–0,5/3,1	0,7/3,4
LDLR177R	1,0/2,4	–0,2/1,6	–	–	2,4/3,7	–0,8/3,0	–0,8/3,3	1,1/3,3	–0,8/3,3	–4,3/1,5
LDLR144F	–	–	Отсутствует	–0,8/4,3	0,2/3,2	2,6/3,6	1,1/3,5	2,1	2,1	1,6/3,2
LDLR144R	–	–	–0,8/4,3	–0,8/3,7	2,4/3,7	–4,3/1,4	–0,8/3,3	1,1/3,3	–0,8/3,3	–0,8/3,7
ACE_F	1,7/3,6	2,4/3,7	0,2/3,2	2,4/3,7	1,4/3,3	1,1/3,7	1,1/3,3	1,4/2,4	–0,2/3,3	–0,7/3,7
ACE_R	1,1/3,1	–0,8/3,0	2,6/3,6	–4,3/1,4	1,1/3,7	–3,6/3,0	1,7/3,1	1,1/2,9	–0,3/1,1	1,1/3,2
eNOSab#30_F	1,0/3,1	–0,8/3,3	1,1/3,5	–0,8/3,3	1,1/3,3	1,7/3,1	1,1/2,4	0,9/2,4	–1,0/3,3	–0,2/3,1
eNOSab#30_R	–0,3/3,1	1,1/3,3	2,1	1,1/3,3	1,4/2,4	1,1/2,9	0,9/2,4	1,4/2,9	1,0/3,3	1,6/2,9
BDKRB2F	–0,5/3,1	–0,8/3,3	2,1	–0,8/3,3	–0,2/3,3	–0,3/1,1	–1,0/3,3	1,0/3,3	3,3	0,7/2,9
BDKRB2R	0,7/3,4	–4,3/1,5	1,6/3,2	–0,8/3,7	–0,7/3,7	1,1/3,2	–0,2/3,1	1,6/2,9	0,7/2,9	1,8/3,7

Окончание табл. 3

Плекс 2	Rs5985F	Rs5985R	Rs1799983F	Rs1799983R	Rs5918F	Rs5918R	Rs2243093F	Rs2243093R	Rs4673F	Rs4673R	Rs4673F2
Rs5985F	1,7	–0,1/0,3	1,7	–0,8/1,1	1,2/3,4	1,0/3,4	–0,8/2,9	1,6/3,4	2,3/3,0	1,1/3,4	1,4/3,4
Rs5985R	–0,1/0,3	3,1	1,1/3,1	1,1/3,2	0,6/2,9	1,1/2,4	1,1/2,9	2,1/3,4	1,1/3,7	1,1/2,5	1,1/3,3
Rs1799983F	1,7	1,1/3,1	Отсутствует	Отсутствует	1,1/3,3	1,0/3,4	1,1/2,9	1,3/3,4	1,6/3,0	2,6/3,4	–0,7/3,4
Rs1799983R	–0,8/1,1	1,1/3,2	Отсутствует	Отсутствует	1,1/2,6	–0,8/2,9	1,1/2,9	2,4/3,4	–0,8/1,6	Отсутствует	–0,8/3,3
Rs5918F	1,2/3,4	0,6/2,9	1,1/3,3	1,1/2,6	1,6/22,6	–0,3/4,1	0,6/3,3	1,1/3,3	–0,5/4,1	–0,5/3,3	1,1/3,3
Rs5918R	1,0/3,4	1,1/2,4	1,0/3,4	–0,8/2,9	–0,3/4,1	–1,3/1,1	–0,3/2,9	–1,3/3,3	–0,8/4,1	–1,5/2,9	–1,3/3,3
Rs2243093F	–0,8/2,9	1,1/2,9	1,1/2,9	1,1/2,9	0,6/3,3	–0,3/2,9	Отсутствует	0,5/3,4	1,1/2,9	1,1/2,9	–2,5/3,3
Rs2243093R	1,6/3,4	2,1/3,4	1,3/3,4	2,4/3,4	1,1/3,3	–1,3/3,3	0,5/3,4	Отсутствует	–0,7/3,4	2,5/2,7	1,0/3,4
Rs4673F	2,3/3,0	1,1/3,7	1,6/3,0	–0,8/1,6	–0,5/4,1	–0,8/4,1	1,1/2,9	–0,7/3,4	–0,8/3,4	–0,8/3,0	–
Rs4673R	1,1/3,4	1,1/2,5	2,6/3,4	Отсутствует	–0,5/3,3	–1,5/2,9	1,1/2,9	2,5/2,7	–0,8/3,0	Отсутствует	–1,5/2,9
Rs4673F2	1,4/3,4	1,1/3,3	–0,7/3,4	–0,8/3,3	1,1/3,3	–1,3/3,3	–2,5/3,3	1,0/3,4	–	–1,5/2,9	0,4/2,4

Конструирование праймеров для минисеквенирования. В отличие от фрагментного анализа, технология SNaPshot подразумевает использование двух типов праймеров: амплификационных (для наработки продукта с мутацией) и праймеров для минисеквенирования (SSHOT праймеры). Согласно рекомендациям разработчика данной технологии (компании Applied Biosystems), праймеры для минисеквенирования должны отличаться друг от друга по длине не менее чем на 4 нуклеотида, в качестве матрицы для отжига можно использовать обе нити ДНК, праймер может состоять из 3’-комплементарной части и 5’-свободной части, с помощью которой можно изменять длину праймера. Подбор параметров позволяет мультиплексировать праймеры, что значительно снижает стоимость одного анализа. При разработке праймеров учитывалось, что температура отжига в реакции минисеквенирования составляет 50 °С, поэтому 3’-комплементарная часть праймера должна иметь температуру плавления порядка 54–57 °С, после этого учитывалось наличие полиморфных участков на 3’-конце праймера (с помощью анализа последовательностей базы данных NCBI), диссоциация образуемых шпилек и праймер-димеров. На следующем этапе в анализ включалась 5’-свободная часть, с помощью которой достигалась желаемая длина праймера. В качестве последовательности 5’-свободной части использовались повторы GACT или части последовательности AACTGACTAA ACTAGGTGCC ACGTCGTGAA AGTCTGACAA [23]. При подборе 5’-свободной части не допускалось образования шпилек с высокими отрицательными значениями dG с последовательностью 3’-комплементарной части, особенно в области 3’-конца. Разработанные праймеры также были проанализированы попарно на наличие праймер-димеров и их диссоциации при температуре 50 °С (температура отжига при реакции минисеквенирования). Вследствие этого в последовательности праймеров RS5918SH и RS2243093SHR были введены точечные замены (выделены курсивом), чтобы избежать образования праймер-димеров с низкими значениями dG (табл. 4).

Таблица 4. **SSHOT праймеры, сконструированные для проведения реакции минисеквенирования**

Table 4. **SSHOT primers designed for minisequencing reactions**

SSHOT праймер, ориентация	5’-свободная часть праймера	3’- комплиментарная часть праймера	Присоединяемый ddNTP	Общая длина праймера, нукл.
RS5985SH прямой	–	CCACAGTGGAGCTTCAGGGC	G, T	20
RS1799983SH прямой	–	CCTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGA	T, G	24
RS1799983SH2 прямой	GACTGACTGACTGA	CTGCTGCAGGCCCCAGATGA	T, G	34

Окончание табл. 4

SSHOT праймер, ориентация	5'-свободная часть праймера	3'- комплиментарная часть праймера	Присоединяемый ddNTP	Общая длина праймера, нукл.
RS1799983SH3R обратный	GACTGACTGACTGA	AGAAGGAAGAGTTCTGGGGG	A, C	34
RS5918SH прямой	GACTGACTGACTGACTG	CTGTCTTACAG*A*CCCTGCCTC	T, C	38
RS2243093SHR обратный	CAACGACGTGAAAGTCTGACAA	CAAGAGGAGGA*C*AGGCATGAGG	A, G	44
RS4673SH прямой	CACTCACTCACTCACTGACTGACTGACT	CTTCACCACGGCGGTCATGT	A, G, T	48

Создание амплификационной системы. Для удобства использования мультиплексных систем необходимо применять универсальные условия для всех маркеров, в частности одинаковую реакционную смесь, программу амплификации, условия разделения и интерпретации результатов. Вследствие применения для двух смесей маркеров разных методов анализа использовать единые условия разделения и интерпретации результатов вызывает определенные трудности. Вместе с тем создание универсальной системы на этапе амплификации целевых продуктов представляется решаемой задачей.

Эффективность разработанных праймеров была апробирована при постановке монолокусных ПЦР реакций при различных температурах отжига, как это было описано в материалах и методах (рис. 1, 2). Из двух пар праймеров локуса LDLR были выбраны праймеры LDLR177, обладающие более широким температурным диапазоном отжига и дающие меньше неспецифических продуктов реакции. Праймеры для всех локусов показали способность нарабатывать

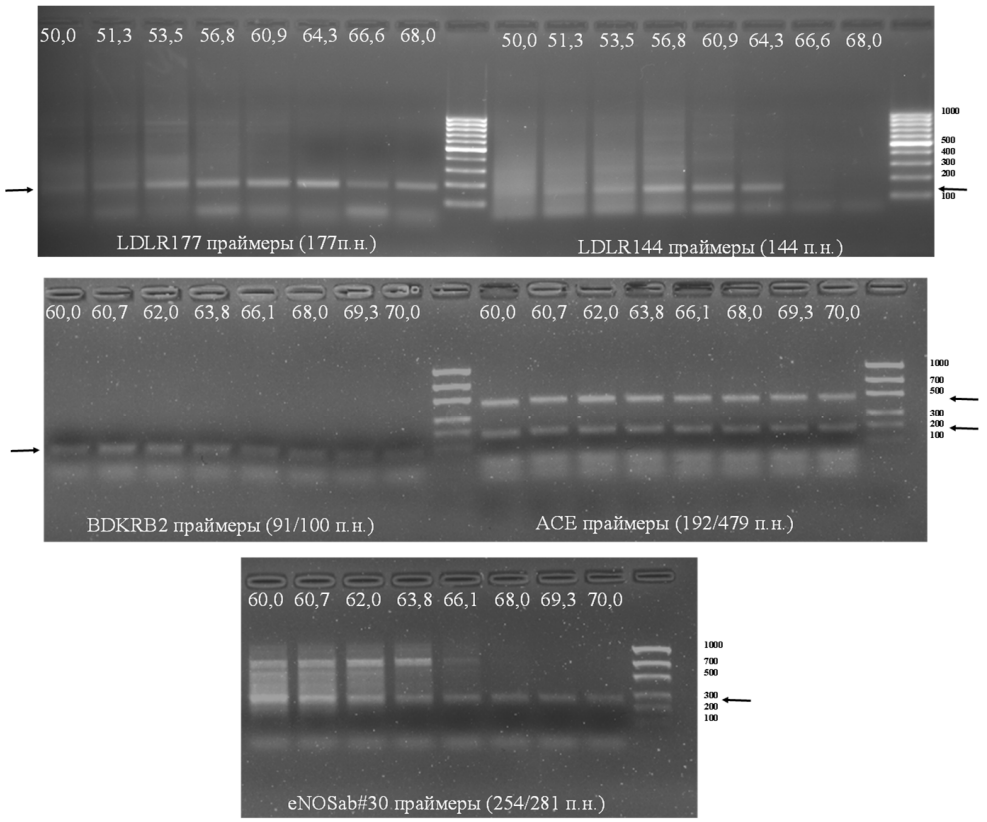

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации с использованием праймеров из смеси № 1 при разных температурах отжига

Fig. 1. Electropherogram of amplification products using primers from mixture N 1 at different annealing temperatures

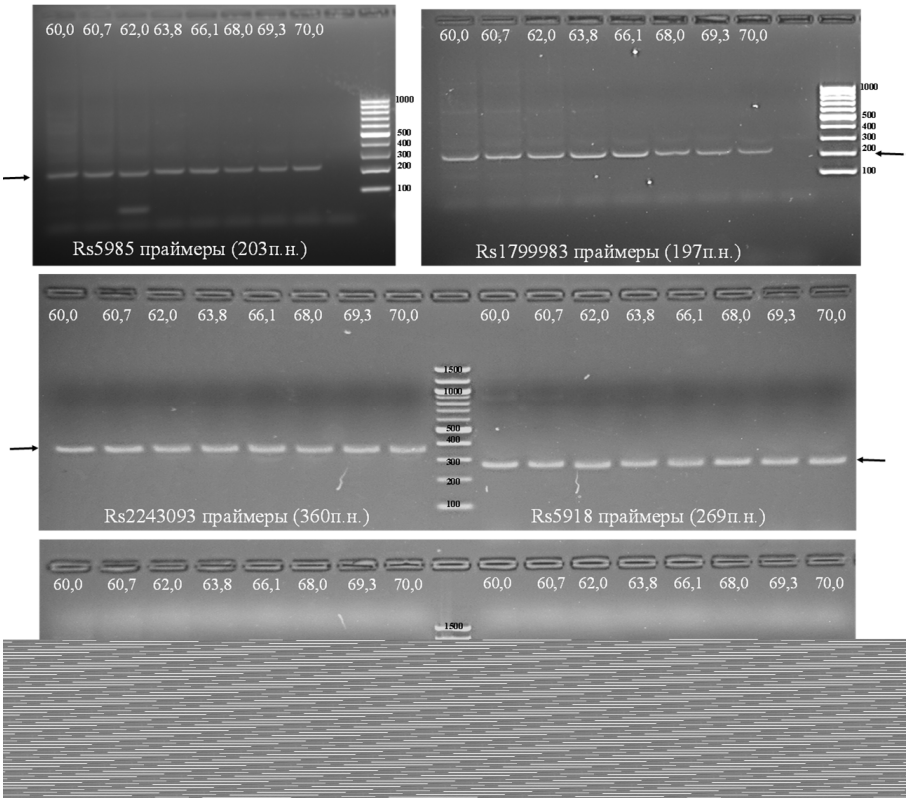

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации с использованием праймеров из смеси № 2 при разных температурах отжига

Fig. 2. Electropherogram of amplification products using primers from mixture N 2 at different annealing temperatures

целевые продукты реакции в диапазоне температуры отжига от 60 до 68 °С. Для сохранения высокой специфичности температурой отжига была выбрана наиболее высокая – 68 °С.

Для оценки эффективности работы амплификационной системы при мультиплексировании были поставлены реакции ПЦР, содержащие все праймеры (для каждой из смесей) в конечной концентрации 0,4 мкМ каждый. Для смеси № 1 оценить образование продуктов реакции возможно постановкой фрагментного анализа. Для смеси № 2 отсутствие какого-либо из ожидаемых продуктов реакции возможно либо из-за несрабатывания амплификационных праймеров в мультиплексе или нефункционального SSHOT праймера. Поэтому продукты амлификации праймеров смеси № 2 были подвергнуты электрофоретическому анализу (рис. 3).

Недостаток разделения в агарозном геле состоит в низкой разрешающей способности для фрагментов схожих по длине. Это наблюдается для продуктов амплификации локусов: rs2243093 (360 п.н.) + rs4673 (F праймер, 337 п.н.); rs5985 (203 п.н.) + rs1799983 (197 п.н.); rs5985 (203 п.н.) + rs1799983 (197 п.н.) + rs4673 (F2 праймер, 215 п.н.). Поэтому после проведения электрофореза область, содержащая все целевые фрагменты, была вырезана из геля, продукты очищены от остатков агарозы и использованы в качестве матрицы при постановке ПЦР реакции с каждой парой праймеров из смеси № 2 отдельно. Анализ продуктов амплификации подтвердил, что все пары праймеров смеси № 2 в реакции мультиплексирования способны нарабатывать целевые продукты (рис. 4).

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации при мультиплексировании праймеров для локусов Rs5918+Rs2243093+Rs5985+Rs1799983+Rs4673.
1 – с праймером F для Rs4673;
2 – с праймером F2 для Rs4673

Fig. 3. Electropherogram of amplification products during multiplexing of primers from loci Rs5918+Rs2243093+Rs5985+Rs1799983+Rs4673.
1 – with primer F for Rs4673;
2 – with primer F2 for Rs4673

Скрининг не менее 50 образцов ДНК позволил более точно установить размерные значения фрагментов, образующихся с использованием смеси № 1. Для локусов eNOSab и ACE, имеющих делеции большого размера, детектируемые фрагменты имели массы, сопоставимые с ожидаемыми: 254 п.н./281 п.н. для eNOSab и 192 п.н./479 п.н. для ACE. Для локуса BDKRB2 наблюдалось смещение на 3 п.н. в меньшую сторону: 91 п.н./100 п.н. = 88,3 п.н./97,5 п.н. Локус LDLR характеризуется STR полиморфизмом по количеству TA повторов. Поэтому для корректной записи «бинов» после скрининга образцов ДНК по данному локусу были отобраны образцы, гомозиготные по количеству TA повторов. С этими образцами проводилась реакция ПЦР, продукты которой были разделены в агарозном геле, вырезаны и очищены. Последовательность полученных ПЦР продуктов была определена секвенированием. Ожидаемая длина фрагмента с количеством TA повторов, равным 8, составляет 177 п.н. Фрагмент с массой 177 п.н. (по результатам фрагментного анализа) после определения нуклеотидной последовательности содержал 9 TA повторов. На основании полученных данных была скорректирована остальная панель «бинов» для локуса LDLR.

Оптимизация условий проведения минисеквенирования. Продукты мультиплексной реакции с праймерами смеси № 2 подвергались пробоподготовке для проведения минисеквенирования, как это описано в материалах и методах. Для проверки применимости праймеров для минисеквенирования первоначально были проведены реакции с каждым из SSHOT праймеров отдельно. Это позволяет также определить размерные диапазоны для каждого локуса. Нами обнаружено, что наибольшее смещение по массе от рассчитанной наблюдается у самых коротких фрагментов. Так, для локуса rs5985 длина фрагментов должна была составлять 21 нуклеотид, однако на практике анализируемые фрагменты разделялись в области 27–29 нуклеотидов и перекрывались с областью разделения для локуса rs1799983. В обоих локусах детектировали нуклеотиды G/T, что также усложняло задачу интерпретации результатов. Для разделения фрагментов данных локусов были разработаны дополнительные SSHOT праймеры – RS1799983SH2 и RS1799983SH3R – для получения фрагментов длиной 35 нуклеотидов. Апробация данных SSHOT праймеров в монолокусной реакции позволила идентифицировать точечные мутации rs1799983, при этом в мультиплекс был включен праймер RS1799983SH2, так как при его использовании при анализе гетерозигот регистрировалось более сбалансированное соотношение интенсивности пиков.

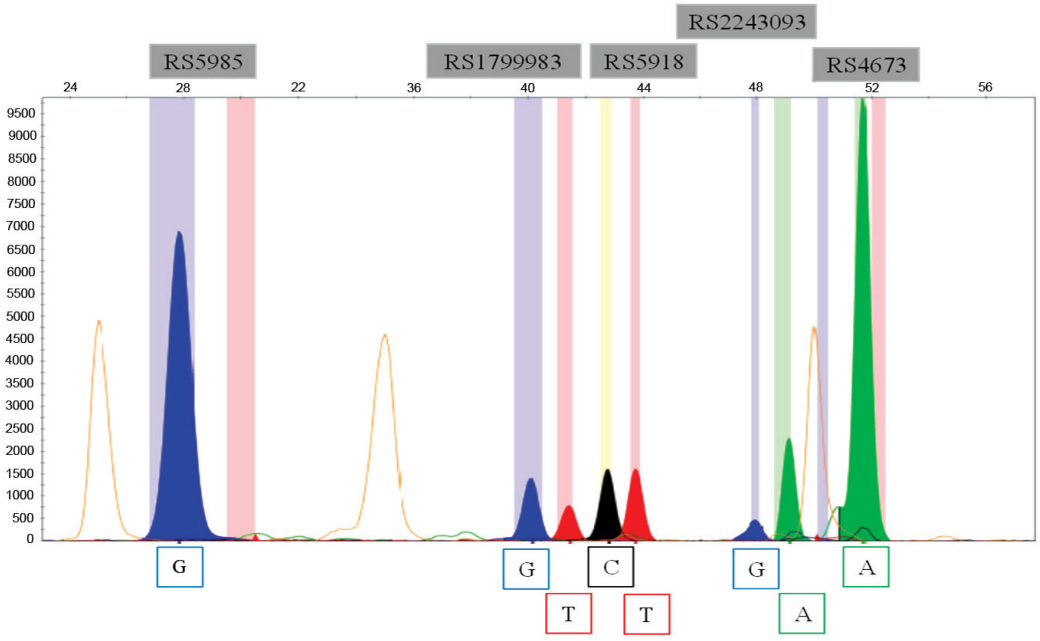

Рис. 6. Электрофореграмма разделения продуктов минисеквенирования после амплификации со смесью праймеров № 2 и последующей реакцией со смесью SSHOT праймеров

Fig. 6. Electropherogram of the minisequencing products separation after amplification with a mixture of primers N 2 and subsequent reaction with a mixture of SSHOT primers

Для определения размерных диапазонов для каждого локуса, а также обнаружения всех возможных вариантов мутаций, потребовался анализ не менее 50 образцов ДНК для каждого из локусов. При постановке реакции минисеквенирования в мультиплексе, каждый SSHOT праймер добавляляся в концентрации 0,2 мкМ. Как видно на рис. 6, подобранные SSHOT праймеры позволяют идентифицировать SNP во всех пяти анализируемых локусах без перекрытия размерных диапазонов каждого из них.

Заключение. Мутации, коррелирующие с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, могут относиться к различным типам: SNP, STR, инсерции, делеции, сдвиг рамки чтения и т.д. Возможность диагностирования данных мутаций в формате единых диагностических систем представляет собой одновременно интересную технологическую задачу и экономически выгодную процедуру. В настоящей работе необходимо было объединить обнаружение однонуклеотидных замен, коротких тандемных повторов и мутаций типа делеция/инсерция. Для решения данной задачи были выбраны методы фрагментного анализа и минисеквенирования на генетическом анализаторе. Это позволило унифицировать этап амплификации и осуществить электрофоретический анализ продуктов в одной плашке. Из недостатков данной методики можно назвать продолжительность пробоподготовки перед реакцией минисеквенирования и высокую стоимость в расчете на одну мутацию относительно метода ПЦР в режиме реального времени или рестрикционного анализа.

При разработке систем подобного типа, по нашему мнению, особое внимание стоит уделить разработке праймеров как амплификационных, так и SSHOT. С целью унификации амплификационной программы необходимо выбирать схожие по длине амплификационные фрагменты, мало различающиеся по процентному содержанию GC пар и температуре плавления. На этапе подбора индивидуальных пар для отдельных локусов особое внимание мы уделяли отсутствию петель и димеризации в 3’-областях праймеров. При создании мультиплексной системы необходимо провести анализ совместимости всех используемых праймеров. При обнаружении сильно отрицательных значений dG (<–4 ккал/моль) для праймер-димеров желательно разработать другие праймеры, провести точечные замены (если они не критичны для отжига праймера) или переформатировать смеси праймеров в рамках разрабатываемой диагностической системы. При разработке SSHOT праймеров наибольшее внимание мы уделяли 3’-комплементарной области – здесь действуют ограничения, с одной стороны, по месту отжига (или смысловая, или антисмысловая нить, расположение непосредственно рядом с мутацией) и, с другой – по длине 3’-участка праймера (температура плавления данного участка должна составлять 54–57 °С, что характерно для длины праймера в 17–21 нуклеотид). При разработке 5’-области учитывалась длина, необходимая для SSHOT праймера, а также отсутствие комплементарных областей с низкими значениями dG для первых пяти нуклеотидов 3’-области любого SSHOT праймера из смеси.

Анализ работоспособности праймеров постановкой ПЦР и последующим разделением продуктов в агарозном геле позволяет подтвердить целесообразность их дальнейшего использования. Использование агарозного геля направлено только на качественное подтверждение наличия продуктов реакции на этапе оптимизации праймеров и часто не коррелирует с картиной результатов фрагментного анализа одного и того же образца. Так, при фрагментном анализе локуса ACE гомозиготы демонстрировали пики продуктов с интенсивностью 2000–4000, а в случае гетерозиготы интенсивность пиков снижалась, при этом интенсивность пика фрагмента с инсерцией могла достигать лишь 20 % от интенсивности пика фрагмента с делецией. Картина электрофореза при разделении продуктов в случае гетерозиготы (рис. 1) демонстрирует высокую интенсивность свечения фрагмента со вставкой и менее интенсивное – фрагмента с делецией. Причиной этого, по нашему мнению, является большая разница (в 2,5 раза) в длине между фрагментами, вследствие чего меньший фрагмент нарабатывается более интенсивно, что приводит к дисбалансу пиков у гетерозиготы. В случае с агарозным гелем фрагмент с инсерцией даже с меньшим количеством копий способен интеркалировать большее количество бромистого этидия, что и увеличивает интенсивность свечения.

Электрофоретический профиль продуктов LDLR локуса характеризуется наличием «теневых» пиков, представляющих собой 2–3 пика с разницей в 2 нуклеотида с возрастающей интен-

сивностью флуоресценции непосредственно перед пиком целевого продукта. Это является широко распространенной картиной амплификации участков с STR повторами, кратными 2–3 нуклеотидам. В случае с LDLR локусом целевой пик всегда по интенсивности в 3–4 раза выше «теневых», что исключает неверное генотипирование по данному локусу.

Технология минисеквенирования позволяет с высокой чувствительностью определять до 10 мутаций типа SNP в одной пробирке. Разработанная нами система праймеров № 2 позволяет определять мутации в пяти локусах интереса. При разработке системы мы столкнулись со смещением фрагментных длин, полученных на приборе, по сравнению с ожидаемыми. Особенно критично это проявилось при анализе фрагментов длиной 20–30 нуклеотидов для локусов rs5985 и rs1799983, поэтому в данном диапазоне мы оставили только один локус, а второй перенесли в более длинный диапазон. При формировании панели анализируемых фрагментов также обнаружено, что чем больше длина анализируемого фрагмента, тем меньше разница между полученной на приборе и ожидаемой длиной. Каждый из четырех флуоресцентно меченных ddNTP в разной степени изменяет подвижность SSHOT праймера одной и той же длины и состава. Поэтому понадобилось не менее 50 образцов ДНК для корректного определения «бинов» для всех локусов.

Смещение панели «бинов» также может наблюдаться при смене прибора, типа полимера, калибратора и размерного стандарта. Решение данной проблемы мы видим в использовании внутреннего стандарта – образца ДНК, содержащего исследуемые локусы с максимальной степенью гетерозиготности, для которого определены размеры амплифицируемых фрагментов.

Проделанная работа позволила разработать диагностическую систему, направленную на выявление девяти мутаций, ассоциированных с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с тем что анализируемые мутации относятся к различным типам, их определение проводилось на генетическом анализаторе, и это позволило унифицировать этапы разделения продуктов реакции и их анализ.

Благодарности. Финансирование работ осуществлялось в рамках Мероприятия 9 НТП Союзного государства «ДНК-идентификация». Авторы выражают благодарность за предоставление информации о маркерах, ассоциированных с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, сотрудникам А. Л. Гончару и М. Д. Амельяновичу Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Acknowledgment. Funding for the work was carried out within the framework of Event 9 of the Scientific and Technical Programm of the Union State “DNA identification”. The authors are grateful to the staff of the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus A. L. Gonchar and M. D. Amelyanovich for providing information on markers associated with the development of cardiovascular diseases.

Список использованных источников

1. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations / A. V. Khera [et al.] // Nat. Genet. – 2018. – Vol. 50, N 9. – P. 1219–1224. http://doi.org/10.1038/s41588-018-0183-z

2. Detection of single base substitutions in total genomic DNA / R. M. Myers [et al.] // Nature. – 1985. – Vol. 313, N 6002. – P. 495–498. http://doi.org/10.1038/313495a0

3. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA / K. Hayashi // Genome Research. – 1991. – Vol. 1, N 1. – P. 34–38. http://doi.org/10.1101/gr.1.1.34

4. Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and Mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage / M. A. Brow [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34, N 12. – P. 3129–3137. http://doi.org/10.1128/JCM.34.12.3129-3137.1996

5. Reflections on a DNA mutation scanning tool / P. Y. Kwok // Nat. Biotechnol. – 2001. – Vol. 19, N 1. – P. 18–19. http://doi.org/10.1038/83454

6. The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection / J. J. Babon [et al.] // Methods Mol. Biol. – 2000. – Vol. 152. – P. 187–199. http://doi.org/10.1385/1-59259-068-3:187

7. RNaseCut: a MALDI mass spectrometry-based method for SNP discovery / S. Krebs [et al.] // Nucleic. Acids. Res. – 2003. – Vol. 31, N 7. – P. e37. http://doi.org/10.1093/nar/gng037

8. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis II: 5’-nuclease assay / S. Latif [et al.] // Genome Res. – 2001. – Vol. 11, N 3. – P. 436–440. http://doi.org/10.1101/gr.156601

9. The Invader assay for SNP genotyping / M. Olivier // Mutat. Res. – 2005. – Vol. 573, N 1–2. – P. 103–110. http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.016

10. SNP genotyping with FRET probes. Optimizing the resolution of heterozygotes / A. Martinez-Garcia [et al.] // Mol. Cell Probes. – 2004. – Vol. 18, N 4. – P. 211–214. http://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.03.003

11. Multilocus genetic risk scores for venous thromboembolism risk assessment / J. M. Soria [et al.] // J. Am. Heart Assoc. – 2014. – Vol. 3, N 5. – P. e001060. http://doi.org/10.1161/JAHA.114.001060

12. Relationship between common eNOS gene polymorphisms and predisposition to coronary artery disease: Evidence from a meta-analysis of 155 published association studies / J. Yu [et al.] // Genomics. – 2020. – Vol. 112, N 3. – P. 2452–2458. http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.01.019

13. Atherosclerotic and thrombotic genetic and environmental determinants in Egyptian coronary artery disease patients: a pilot study / M. S. Fawzy [et al.] // BMC Cardiovasc. Disord. – 2017. – Vol. 17, N 1. – P. 26. http://doi.org/10.1186/s12872-016-0456-3

14. Клинико-генетический анализ факторов риска развития острой и хронической ишемии головного мозга / А. В. Анисимова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. – 2019. – Т. 119, № 3. – С. 62–67. http://doi.org/10.17116/jnevro201911903262

15. Association analysis of rs1049255 and rs4673 transitions in p22phox gene with coronary artery disease: A case-control study and a computational analysis / M. Mazaheri [et al.] // Ir. J. Med. Sci. – 2017. – Vol. 186, N 4. – P. 921–928. http://doi.org/10.1007/s11845-017-1601-4

16. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel / A. C. Sturm [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2018. – Vol. 72, N 6. – P. 662–680. http://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044

17. Ethnic differences in the association between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and peripheral vascular disease: A meta-analysis / C. Han [et al.] // Chronic Dis. Transl. Med. – 2017. – Vol. 3, N 4. – P. 230–241. http://doi.org/10.1016/j.cdtm.2017.07.002

18. The relationship between coronary artery ectasia and eNOS intron 4a/b gene polymorphisms / A. Ekmekci [et al.] // Acta Cardiol. – 2013. – Vol. 68, N 1. – P. 19–22. http://doi.org/10.1080/ac.68.1.2959627

19. The bradykinin type 2 receptor BE1 polymorphism and ethnicity influence systolic blood pressure and vascular resistance / M. M. Pretorius [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. – 2008. – Vol. 83, N 1. – P. 122–129. http://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100250

20. ACE Insertion/Deletion Polymorphism (rs4646994) Is Associated With the Increased Risk of Multiple Myeloma / S. Zmorzynski [et al.] // Front. Oncol. – 2019. – Vol. 9. – P. 44. http://doi.org/10.3389/fonc.2019.00044

21. The -9/+9 polymorphism of the bradykinin receptor Beta 2 gene and athlete status: a study involving two European cohorts / M. Sawczuk [et al.] // Hum. Biol. – 2013. – Vol. 85, N 5. – P. 741–756. http://doi.org/10.3378/027.085.0511

22. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software / B. Thornton and C. Basu // Biochem. Mol. Biol. Educ. – 2011. – Vol. 39, N 2. – P. 145–154. http://doi.org/10.1002/bmb.20461

23. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs--a model with 35 Y chromosome SNPs / J. J. Sanchez [et al.] // Forensic. Sci. Int. – 2003. – Vol. 137, N 1. – P. 74–84. http://doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00299-8

References

1. Khera A. V., Chaffin M., Aragam K. G., Haas M. E., Roselli C., Choi S. H., Natarajan P., Lander E. S., Lubitz S. A., Ellinor P. T., Kathiresan S. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nature Genetics*, 2018, vol. 50, no. 9, pp. 1219–1224. http://doi.org/10.1038/s41588-018-0183-z

2. Myers R. M., Lumelsky N., Lerman L. S.,Maniatis T. Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature*, 1985, vol. 313, no. 6002, pp. 495–498. http://doi.org/10.1038/313495a0

3. Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research*, 1991, vol. 1, no. 1, pp. 34–38. http://doi.org/10.1101/gr.1.1.34

4. Brow M. A., Oldenburg M. C., Lyamichev V., Heisler L. M., Lyamicheva N., Hall J. G., Eagan N. J., Olive D. M., Smith L. M., Fors L., Dahlberg J. E. Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and Mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. *Journal of clinical microbiology*, 1996, vol. 34, no. 12, pp. 3129–3137. http://doi.org/10.1128/JCM.34.12.3129-3137.1996

5. Kwok P. Y. Reflections on a DNA mutation scanning tool. *Nature Biotechnology*, 2001, vol. 19, no. 1, pp. 18–19. http://doi.org/10.1038/83454

6. Babon J. J., McKenzie M., Cotton R. G. The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection. *Methods in molecular biology*, 2000, vol. 152, pp. 187–199. http://doi.org/10.1385/1-59259-068-3:187

7. Krebs S., Medugorac I., Seichter D., Forster M. RNaseCut: a MALDI mass spectrometry-based method for SNP discovery. *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, no. 7, pp. e37. http://doi.org/10.1093/nar/gng037

8. Latif S., Bauer-Sardina I., Ranade K., Livak K. J., Kwok P. Y. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis II: 5'-nuclease assay. *Genome Research*, 2001, vol. 11, no. 3, pp. 436–440. http://doi.org/10.1101/gr.156601

9. Olivier M. The Invader assay for SNP genotyping. *Mutation Research*, 2005, vol. 573, no. 1–2, pp. 103–110. http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.016

10. Martinez-Garcia A., Sastre I., Tenorio R., Bullido M. J. SNP genotyping with FRET probes. Optimizing the resolution of heterozygotes. *Molecular and Cellular Probes*, 2004, vol. 18, no. 4, pp. 211–214. http://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.03.003

11. Soria J. M., Morange P. E., Vila J., Souto J. C., Moyano M., Tregouet D. A., Mateo J., Saut N., Salas E., Elosua R. Multilocus genetic risk scores for venous thromboembolism risk assessment. *Journal of the American Heart Association*, 2014, vol. 3, no. 5, pp. e001060. http://doi.org/10.1161/JAHA.114.001060

12. Yu J., Wu X., Ni J., Zhang J. Relationship between common eNOS gene polymorphisms and predisposition to coronary artery disease: Evidence from a meta-analysis of 155 published association studies. *Genomics*, 2020, vol. 112, no. 3, pp. 2452–2458. http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.01.019

13. Fawzy M. S., Toraih E. A., Aly N. M., Fakhr-Eldeen A., Badran D. I., Hussein M. H. Atherosclerotic and thrombotic genetic and environmental determinants in Egyptian coronary artery disease patients: a pilot study. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 26. http://doi.org/10.1186/s12872-016-0456-3

14. Anisimova A. V., Gunchenko A. S., Ikonnikova A. Y., Galkin S. S., Avdonina M. A., Nasedkina T. V. A clinical and genetic analysis of risk factors for the development of acute and chronic cerebral ischemia. *Journal of Neurology and Psychiatry*, 2019, vol. 119, no. 3, pp. 62–67 (in Russian). http://doi.org/10.17116/jnevro201911903262

15. Mazaheri M., Karimian M., Behjati M., Raygan F., Hosseinzadeh Colagar A. Association analysis of rs1049255 and rs4673 transitions in p22phox gene with coronary artery disease: A case-control study and a computational analysis. *Irish journal of medical science*, 2017, vol. 186, no. 4, pp. 921–928. http://doi.org/10.1007/s11845-017-1601-4

16. Sturm A. C., Knowles J. W., Gidding S. S., Ahmad Z. S., Ahmed C. D., Ballantyne C. M., Baum S. J., Bourbon M., Carrie A., Cuchel M., de Ferranti S. D., Defesche J. C., Freiberger T., Hershberger R. E., Hovingh G. K., Karayan L., Kastelein J. J. P., Kindt I., Lane S. R., Leigh S. E., Linton M. F., Mata P., Neal W. A., Nordestgaard B. G., Santos R. D., Harada-Shiba M., Sijbrands E. J., Stitziel N. O., Yamashita S., Wilemon K. A., Ledbetter D. H., Rader D. J., Convened by the Familial Hypercholesterolemia F. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of the American College of Cardiology*, 2018, vol. 72, no. 6, pp. 662–680. http://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044

17. Han C., Han X. K., Liu F. C., Huang J. F. Ethnic differences in the association between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and peripheral vascular disease: A meta-analysis. *Chronic diseases and translational medicine*, 2017, vol. 3, no. 4, pp. 230–241. http://doi.org/10.1016/j.cdtm.2017.07.002

18. Ekmekci A., Ozcan K. S., Abaci N., Gungor B., Osmonov D., Tosu R., Toprak E., Gulec C., Ustek D., Oz D., Eren M. The relationship between coronary artery ectasia and eNOS intron 4a/b gene polymorphisms. *Acta cardiologica*, 2013, vol. 68, no. 1, pp. 19–22. http://doi.org/10.1080/ac.68.1.2959627

19. Pretorius M. M., Gainer J. V., Van Guilder G. P., Coelho E. B., Luther J. M., Fong P., Rosenbaum D. D., Malave H. A., Yu C., Ritchie M. D., Vaughan D. E., Brown N. J. The bradykinin type 2 receptor BE1 polymorphism and ethnicity influence systolic blood pressure and vascular resistance. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 2008, vol. 83, no. 1, pp. 122–129. http://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100250

20. Zmorzynski S., Szudy-Szczyrek A., Popek-Marciniec S., Korszen-Pilecka I., Wojcierowska-Litwin M., Luterek M., Chocholska S., Styk W., Swiderska-Kolacz G., Januszewska J., Mielnik M., Hus M., Filip A. A. ACE Insertion/Deletion Polymorphism (rs4646994) Is Associated With the Increased Risk of Multiple Myeloma. *Frontiers in oncology*, 2019, vol. 9, pp. 44. http://doi.org/10.3389/fonc.2019.00044

21. Sawczuk M., Timshina Y. I., Astratenkova I. V., Maciejewska-Karlowska A., Leonska-Duniec A., Ficek K., Mustafina L. J., Cieszczyk P., Klocek T., Ahmetov, II The -9/+9 polymorphism of the bradykinin receptor Beta 2 gene and athlete status: a study involving two European cohorts. *Human biology*, 2013, vol. 85, no 5, pp. 741–756. http://doi.org/10.3378/027.085.0511

22. Thornton B., Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, vol. 39, no. 2, pp. 145–154. http://doi.org/10.1002/bmb.20461

23. Sanchez J. J., Borsting C., Hallenberg C., Buchard A., Hernandez A., Morling N. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs-a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic science international,* 2003, vol. 137, no. 1, pp. 74–84. http://doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00299-8

Информация об авторах

Ирина Витальевна Гайдукевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ribano4ka@gmail.com

Анна Михайловна Горькавая – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: annagorkavaya@gmail.com

Анна Викторовна Грудо – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vasilevskaya.av@gmail.com

Геннадий Валерьевич Сергеев – канд. хим. наук, зав. лаб. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gvserg@iboch.by

Сергей Александрович Усанов – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.by

Information about the authors

Irina V. Haidukevich – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ribano4ka@gmail.com

Anna M. Gorkavaya – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: annagorkavaya@gmail.com

Anna V. Grudo – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vasilevskaya.av@gmail.com

Gennady V. Sergeev – Ph. D. (Chemistry), Head of the laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gvserg@iboch.by

Sergei A. Usanov – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Chemistry), Professor, Principal Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.by