РАЗДЕЛ XVII. НАНОТЕХНОЛОГИИ

Иошева Е.А.¹, Леонтьева Д.Р.², Филиппова Е.А.², Иванченко О.Б.¹

Разработка мультиплексного анализа полимеразной цепной реакции в реальном времени для обнаружения SNP PKD1 домашней кошки

¹ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»²Центр Ветеринарной Генетики «ЗООГЕН»
(Россия, Санкт-Петербург)

doi: 10.18411/trnio-11-2021-135

Аннотация

Аутосомно-доминантная поликистозная болезнь почек (ADPKD) — это достаточно распространенное наследственное генетическое заболевание кошек, особенно часто поражающее кошек персидской породы. До недавнего времени это заболевание диагностировалось с помощью ультразвукового исследования почек. При использовании молекулярных методов стало возможно выявлять поликистоз почек до появления первых симптомов заболевания. Был разработан быстрый и чувствительный анализ генотипирования с помощью ПЦР в реальном времени, который может выявить однонуклеотидный полиморфизм, ответственный за AD-PKD.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, поликистоз почек домашних кошек, однонуклеотидный полиморфизм, генотипирование.

Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a common hereditary genetic disorder in cats, particularly affecting Persian cats. Until recently, this disease was diagnosed using kidney ultrasound. With the use of molecular methods, it became possible to detect polycystic kidney disease before the first symptoms of the disease appeared. A fast and sensitive real-time PCR genotyping assay has been developed that can identify the single nucleotide polymorphism responsible for AD-PKD.

Keywords: polymerase chain reaction, polycystic kidney disease of domestic cats, single nucleotide polymorphism, genotyping.

Введение

В последние десятилетия большое внимание ветеринарных врачей и заводчиков кошек волнует проблема поликистоза почек у длинношерстных, в основном, персидских кошек. Данное заболевание изучается повсеместно, написано достаточно много статей в медицинской и научно-популярной периодике США и Европы, касающейся кошек этой породы.

О поликистозе почек известно с 1967 года и это явление впервые описано сотрудниками Университете штата Огайо при обследовании шестилетней персидской кошки, поступившей с симптомами почечной недостаточности, явившейся следствием поликистоза почек.

Аутосомно-доминантная поликистозная болезнь почек (ADPKD) — это наследственное заболевание с формированием почечных кист, вызывающее постепенное увеличение обеих почек, иногда прогрессирующее до почечной недостаточности. Почти все его формы вызваны семейной генетической мутацией. Данное заболевание является наиболее распространенным наследственным генетическим заболеванием кошек, поражающим 40–50% персов во всем мире [1–5].

Болезнь характеризуется образованием почечных кист [6], которые могут быть обнаружены с помощью ультразвукового обследования [7].

В 2004 году группа исследователей в США выявили ген в PKD 1, гене персидских кошек, генетическую мутацию, который был связан с ADPKD [8]. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) был идентифицирован в экзоне 29 (трансерсия С – А). Была исследована 81 кошка с предполагаемым диагнозом – поликистоз почек. PKD был подтвержден с помощью ультразвука у 48 животных, а также все мутации идентифицированы полиморфизмом длины рестрикционного фрагмента (ПДРФ). В то время как ни у одной из 33 здоровых кошек, по результатам УЗИ и ПДРФ, не было мутации [8].

В настоящее время для диагностики заболевания разработан быстрый, точный и чувствительный мультиплексный анализ полимеразной цепной реакции в реальном времени для обнаружения SNP PKD1 в геномной ДНК, выделенной из биологического материала кошек.

Материалы и методы

Объектами исследования явился биологический материал (сухая кровь и клетки буккального эпителия) домашних кошек, поступающий в Центр Ветеринарной Генетики «ЗООГЕН» (г.Санкт-Петербург).

Обнаружение SNP PKD1 в геномной ДНК проводили методом ПЦР в реальном времени. В работе использовали праймеры и зонды предложенные Хэлпсом и соавторами [10]. Для данного метода использовались зонды с LNA. LNA (locked nucleic acid) – нуклеотиды, имеющие фиксированную конформацию рибозного фрагмента. Как правило у олигонуклеотидов с LNA-модификациями увеличена чувствительность и специфичность. Такие нуклеотиды образуют более термостабильные дуплексы, что позволяет использовать более короткие праймеры.

Один зонд с LNA используется для обнаружения аллели дикого типа, а второй для обнаружения мутантного аллеля. Зонд дикого типа был помечен 6-карбоксифлуоресцеином (FAM), в то время как зонд AD-PKD был помечен карбокси-X-родамин родамином (ROX).

Для выделения ДНК из биологического материала животных использовались комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» и «Рибо-сорб» (пр-во г. Москва). Набор реагентов «ДНК-сорб-АМ» использовался для выделения клеток буккального эпителия, набор реагентов «Рибо-сорб» использовался для выделения геномной ДНК из образцов сухой крови животных.

Генотипирование методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием смеси праймеров и зондов синтезированных компанией «Синтол» (г.Москва). Прямой праймер 100 нМ (5'-GACAAGCATCTCTGGCTCTCC-3'), обратный праймер 100 нМ (5'-ACGACCCCGTACCACACAG-3'), 100 нМ дикого типа зонд (5'-FAM-tgTgCgtCctc-BHQ1-3'), прописные буквы LNA, строчная ДНК), зонд ADPKD 100 нМ (5'-HEX-ctgTtgAgtCctc-BHQ1-3') [10]. Термоциклирование выполняли в амплификаторе DT lite (ДНК-Технология, г.Москва) в течение 1 цикла 95 ° С в течение 3 мин, затем 42 цикла: 95°С в течение 10 с и 62°С в течение 30 с. Флуоресценция была при 530 и 605 нм во время отжига. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечение «ДНК-Технология» версии 7.9.

Результаты и обсуждение

На рисунках 1 и 2 показаны результаты амплификации. Результат на рисунке 1 соответствует генотипу дикого типа (канал FAM), а на рисунке 2 показан гетерозиготный результат (каналы FAM и ROX).

Для расчета чувствительности анализа ПЦР в реальном времени были сделаны серийные десятикратные разведения геномных ДНК. Анализ надежно обнаруживает разведения от 100 нг до 200 пг перреакции геномной ДНК с коэффициентом корреляции 0,999.

Рисунок 1. Результат детекции по каналам FAM и ROX

Рисунок 2. Результат детекции по каналу FAM

Для исследования было взяты образцы биологического материала кошек, поступивших в лабораторию для исследования на поликистоз почек в период с 8.10 по 20.10.2021года. Среди них был 61 образец буккального эпителия и 16 образцов клеток сухой крови. Независимо от того, образец крови или буккальный мазок, надежный генотип был получен из всех образцов. Общая распространенность ADPKD в этих образцах составляла 8,2%. Из 7 идентифицированных кошек с ADPKD все были гетерозиготными.

1. Cannon MJ, MacKay AD, Barr FJ, Rudolf H, Bradley KJ, GruffyddJones TJ. Prevalence of polycystic kidney disease in Persian cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 2001;149:409–11.
2. Beck C, Lavelle RB. Feline polycystic kidney disease in Persian and other cats: a prospective study using ultrasonography. *Aust Vet J* 2001;79:181–4.
3. Barthez PY, Rivier P, Begon D. Prevalence of polycystic kidney disease in Persian and Persian related cats in France. *J Feline Med Surg* 2003; 5:345–7.
4. Barrs VR, Gunew M, Foster SF, Beatty JA, Malik R. Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian cats and related-breeds in Sydney and Brisbane. *Aust Vet J* 2001;79:257–9.
5. Cooper B. Autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian cats. *Feline Pract* 2000;28:20–1.

6. Eaton KA, Biller DS, DiBartola SP, Radin MJ, Wellman ML. Autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian and Persiancross cats. *Vet Pathol* 1997;34:117–26.
7. iller DS, DiBartola SP, Eaton KA, Pflueger S, Wellman ML, Radin MJ. Inheritance of polycystic kidney disease in Persian cats. *J Hered* 1996;87:1–5.
8. Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, Lipinski MJ, Young AE, Roe BA, et al. Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2548–55.
9. O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Yuhki N. The Feline Genome Project. *Annu Rev Genet* 2002;36:657–86.
10. Helps CR, Tasker S, Barr FJ, Wills SJ, Gruffydd-Jones TJ. Detection of the single nucleotide polymorphism causing feline autosomal-dominant polycystic kidney disease in Persians from the UK using a novel real-time PCR assay. *Mol. Cell. Probe.* 2007;21:31–34.