Министерство образования Российской Федерации

Новосибирский Государственный Университет

Факультет Естественных Наук

Кафедра молекулярной биологии

Отчёт по большому биохимическому практикуму:

Определение уровня гетероплазмии митохондриальной ДНК человека по результатам высокопроизводительного секвенирования

Руководитель: к.б.н. Дрёмов С.В.

Выполнила: Каманова Е.П.

Новосибирск 2017 г.

**Введение**

Гетероплазмия – феномен сосуществование в клетке двух или более вариантов митохондриального гаплотипа (Taylor, Turnbull, 2005). В результате высокой скорости мутирования и многократной репликации мтДНК, новые мутации закрепляются в геноме, что ведет к возникновению гетероплазмии. Уровень гетероплазмии (отношение количества мутантных молекул ДНК к их общем количеству) патогенных генеративных мутаций мтДНК влияет на экспрессивность и пенетрантность митохондриальных заболеваний. Различные ткани и органы зависят от митохондриальной активности в разной степени, следовательно, будут обладать различным пороговым значением гетероплазмии митохондриальной ДНК для нарушения энергетического обмена и дисфункции определенного органа или ткани. Встречаемость гетероплазмии на уровне 1-3%, по позициям, связанным с развитием заболеваний, разными авторами оценивается в 2,5% (Li et al., 2010) или 20% (Ye et al., 2014) популяции здоровых людей. Ранее гетероплазмия мтДНК рассматривалась только в пределах гипервариабельного сегмента контрольного региона. Сейчас технологии секвенирования нового поколения позволяют зафиксировать гетероплазмию на протяжении всей молекулы мтДНК с высокой точностью за счет большого количества прочтений.

Наследственная оптическая нейропатия зрительного нерва Лебера(LHON) - наследственное митохондриальное заболевание, приводящее к серьезным нарушениям зрения, вследствие дегенерации ганглионарных нейронов сетчатки. Уже известно более 30 ассоциированных с LHON смысловых мутаций мтДНК в генах белков дыхательной цепи (Fraser *et al.*, 2010). Анализ уровня гетероплазмии в зрительном нерве, относительно других тканей одного организма, может доказать тканеспецифичность отдельных мутаций.

Цель работы – выявление тканеспецифичных мутаций и определение уровня гетероплзамии в митохондриальной ДНК людей, страдающих наследственной оптической нейропатией зрительного нерва Лебера, на основе данные высокопроизводительного секвенирования

Задчи:

1. Выделть ДНК из образцов крови пациентов и контрольной группы
2. Провести ПЦР для наработки митохондриальной ДНК
3. Оценить качества коротких прочтений
4. Определить тканеспецифичные мутации и уровнь гетероплазмии

**Материалы**

Основой для исследования послужили данные полногеномного секвенирования мтДНК, пациентов с LHON (7698760 шт), накопленные лабораторией. В настоящей работе в качестве контрольной группы полногеномному секвенированию митохондриальной ДНК подвергли пробы от (перечислить народы и их количество). Общая выборка для анализа мтДНК составила 3464й5 образца: 7648 новые последовательности получены в ходе настоящей работы и 153434342 опубликованы ранее.

**Методы молекулярного анализа**

1. Выделение ДНК

Выделение ДНК из лейкоцитарного слоя образца крови донора проводили при помощи набора для выделения ДНК из цельной крови человека на магнитных частицах (SileksMagNA-G), согласно указаниям производителя. Принцип используемого в наборе метода основан на обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц.

Протокол выделения ДНК включал в себя следующие стадии:

* В образец крови (100мкл) добавляли 120 мкл буфера START, хорошо перемешивали и инкубировали 5 мин
* В отдельной̆ чистой̆ пробирке смешивали следующие компоненты: 240 мкл хорошо перемешанного буфера Lysis&Binding и 7 мкл хорошо перемешанных магнитных частиц (SileksMagNA-G для выделения ДНК). Тщательно перемешивали эту смесь.
* Добавляли приготовленную суспензию магнитных частиц в пробирку с образцом. Инкубировали в течение 3 минут при комнатной̆ температуре. Во время инкубации несколько раз перемешивали содержимое пробирки.
* Помещали пробирку в магнитных штатив для сбора частиц, удаляли супернатант.
* Перемещали пробирку в немагнитный штатив, ресуспендировали магнитные частицы в 300 мкл хорошо перемешанного буфера Wash 1 и тщательно перемешивали до получения гомогенной суспензии. Перенесли полученную суспензию в 1.5 мл пробирку для дальнейшего выделения.
* Помещали пробирку в магнитный штатив для сбора частиц, удалите супернатант
* Повторяли пункт 5 и 6 три раза с буферами Wash 1, Wash 2 и Final Wash соответственно.
* Инкубировали пробирку в термостате при 60 °C в течение 5 минут, чтобы высушить осадок частиц.
* Добавляли 50мкл буфера Elution. Тщательно ресуспендировали частицы до получения гомогенной суспензии и инкубировали в термостате при 60°C в течение 5 минут.
* Поместили пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Перенесли ДНК-содержащий̆ супернатант в чистую пробирку.

1. Полимеразная цепная реакция

Реакцию проводили в 25 мкл смеси следующего состава: 5 μl буфера PCR Buffer 5X Kapa, 1.75 MgCl2, 0.75 µl дНТФ (10mM), 2.5 µl праймера hmtL, 2.5 µl праймера hmtH (пары праймеров указаны в Таблице 2), 0.25 µl полимеразы Long Range Hot Start KAPA (2.5 U/μl), 10 нг ДНК.

Таблица 2. Список олигонуклеотидов, использовавшихся в роли праймеров для проведения ПЦР.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| название | Последовательноть (5’ → 3’) | Размер, п. н. |
| mtL13389 | TCCATCATCCACAACCTTAAC | 9933 |
| mtH6753 | TGTGCTCACACGATAAACCC |
| mtL6563 | ACCTCAACACCACCTTCTTC | 7996 |
| mtH14559 | GATTGTTAGCGGTGTGGTCG |

Реакция ПЦР осуществлялась в амплификаторе (Bio-Rad C1000™ thermal cyclers) со следующим температурным профилем:

94°С – 180 с, 35 циклов (94°С – 25 с, 60°С – 15 с, 68°С – 710 с), 72°С – 710 с, 12°С - ∞.

1. Гель-электрофорез

Визуализацию результатов ПЦР осуществляли при помощи гель-электрофореза в агарозном геле. В агарозный гель (1% раствор агарозы в TAE-буфере (40 мM Трис- ацетат (pH7.6), 1 мM ЭДТА)) для визуализации фрагментов ДНК добавляли бромистый этидий до концентраций 0.5 мкг/мл. Затем гель заливали в камеры для горизонтального электрофореза. При нанесении на гель каждую пробу предварительно смешивали с 2 мкл буфера для загрузки в гель (60% глицерин, 0.6% бромфеноловый синий).

1. Секвенирование

Приготовление библиотек из ампликонов и последующее их секвенирование на платформе Illumina HiSeq выполнялось в ЗАО «Геноаналитика», Москва.

**Методы биоинформатического анализа**

Оценка коротких прочтения Illumina была осуществленна программой FastQC. Адаптерные последовательности удалены при помощи AdapterRemoval v2.2.1 (Schubert et al., 2016). Отфильтрованные короткие прочтения были картированы на последовательность Reconstructed Sapiens Reference Sequence (RSRS) (Behar et al., 2012) при помощи BWA-MEM v0.7.15 (Li, 2013). Консенсусные последовательности и координаты мутаций ДНК получали при помощи GATK 3.8-0 (McKenna et al. 2010). Уровень гетероплазмии определяли ………..

**Результаты**

Визуализация продуктов ПЦР митохондриальной последовательности при помощи гель-электрофореза представлена на рисунке 1

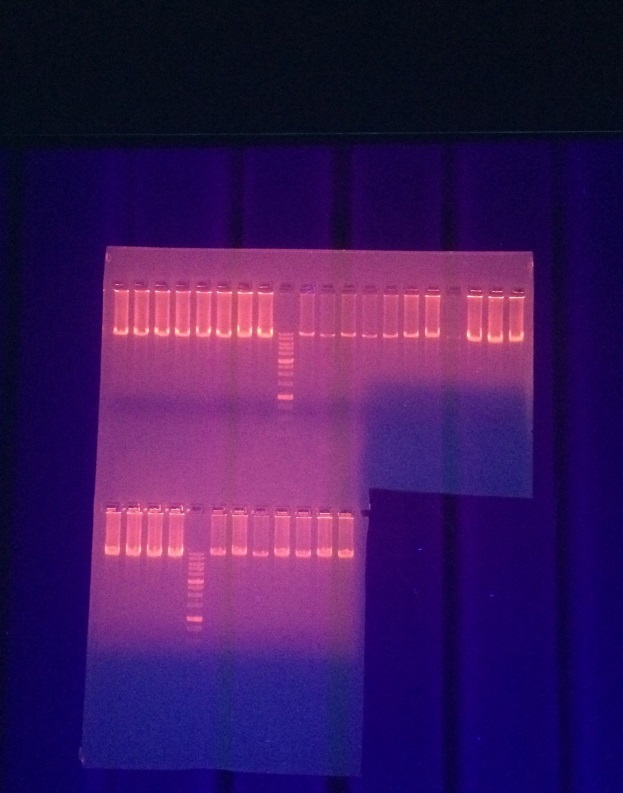


Рисунок 1. Продукты ПЦР митохондриальной последовательности

На основании отчета FastQC был сделан вывод о том, что результаты секвенирования генома мтДНК пациентов с LHON содержат в среднем 580700 прочтений длинной 50 п.н., средний GC-контент которых составил 44-45%. Среднее покрытие составило 1042 – 9574, с Phred quality scores 37 – 38

Результаты секвенирования контрольной группы показали среднее число прочтений 544029 длинной 50 п.н., c GC-составом 44-45%. Среднее покрытие