

# ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ВАРИАЦИИ И ИХ ДЕТЕКЦИЯ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

**В. Г. Яковлева**

*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,  
220030, г. Минск, Беларусь, valeria.yakovleva2004@gmail.com  
Научный руководитель — И. Н. Ильющёнок, кандидат биологических наук*

Однонуклеотидные вариации являются самыми распространенными мутациями в геноме и могут значительно изменять функции ДНК, РНК и белков. Они играют значительную роль в генетической изменчивости, предрасположенности к заболеваниям и реакции на различные вещества. Целью данной работы является анализ современной научной литературы по вопросам происхождения однонуклеотидных вариаций, их биологической роли и методов детекции в клетках человека.

**Ключевые слова:** однонуклеотидные вариации; мутации; методы детекции SNV.

Однонуклеотидные вариации (SNV) являются самыми распространенными и широко представленными изменениями в человеческом геноме. Это мутации, которые возникают на месте одного нуклеотида, и могут встречаться как в белок-кодирующих последовательностях, так и в некодирующих или межгенных областях. Считается, что у среднестатистического человека насчитывается около 3–4 миллионов SNVs, которые могут возникать в результате действия физических и химических факторов. Но чаще всего возникновение SNV является следствием ошибок репликации ДНК [1].

SNVs могут оказывать различное влияние на организм, вызывая изменения в процессах репликации, транскрипции, сплайсинга, трансляции, экспрессии или функционировании белка. При этом эффект будет зависеть от точного расположения данной вариации в геноме, а также ее природы. Некоторые из данных мутаций синонимичны и не оказывают никакого значительного эффекта, другие – нонсенс мутации – могут нокаутировать ген за счет внесения дополнительного стоп-кодона в рамки считывания [2]. Так называемые миссенс-мутации за счет переключения кодона на кодирование другой аминокислоты, будут приводить к частичной потере или усилению функций гена. Мутации в некодирующих областях (интронах или энхансерах) неблагоприятно влияют на уровень экспрессии или правильность сплайсинга мРНК [3].

Самой известной болезнью, вызванной SNV, является серповидно-клеточная анемия. В 20 – 50 % случаев наработка фетального гемоглобина связана с наличием SNV в трех локусах: BCL11A, регулирующего переключение между синтезом эмбрионального и взрослого гемоглобина в

клетке, межгенной области HBS1L-MYB, в которой расположен ряд последовательностей, регулирующих экспрессию фетального гемоглобина, и внутри  $\beta$ -подобного глобинового локуса [4]. Некоторые SNV могут вызывать заболевания сердечно-сосудистой системе. Например, полиморфизмы в гене рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (rs7396366, rs4680, и rs4714210) связаны с риском развития ишемической болезни сердца [5]. Некоторые SNV связаны с развитием гипертензии (rs4680), атеросклероза (rs4633 и rs4680), тромбозов вен (rs2097603, rs4633, rs4680, и rs174699), тахикардии (rs324420) [6]. Самыми распространенными патологиями, вызванными SNV, являются онкологические [7].

Методы детекции SNV можно разделить на методы детекции уже известных мутаций и методы обнаружения не выявленных ранее SNV. К первой группе относятся аллель-специфическая ПЦР и различные ДНК чипы, ко второй – секвенирование по Сэнгеру и секвенирование нового поколения [8].

Аллель-специфическая ПЦР является модифицированной версией стандартной. Все этапы (денатурация, отжиг праймеров и элонгация) проходят как обычно, однако вместе со стандартным обратным праймером используется от 2 до 4 прямых аллель-специфических праймеров с модифицированными флуоресцентной меткой концами, которые амплифицируют ПЦР-продукты разной длины. С помощью данного метода можно быстро различать гомозигот и гетерозигот, а также понять, есть ли мутация в уже известном сайте. Аллель-специфическая ПЦР является эффективным и экономически выгодным методом, однако благодаря ему возможно определение SNV только в заранее известных участках. Недостатком метода является и необходимость разработки большого количества специфических праймеров [9].

В основе работы ДНК-чипов лежит гибридизация на иммобилизованном субстрате. После выделения и очистки ДНК необходимо провести этап подготовки библиотеки, который заключается в амплификации целевого фрагмента с помощью ПЦР, в течение которой в ДНК включаются нуклеотиды с флуоресцентными метками. После чего на чипе происходит процесс гибридизации, после которого чип сканируют лазером. Далее генотип SNV может быть определен в соответствии с интенсивностью флуоресценции продуктов. Метод позволяет типировать SNV на уровне генома, он точный и наглядный, однако для подготовки чипа и анализа результатов требуются предварительные данные о последовательности [10].

В настоящее время секвенирование по Сэнгеру является золотым стандартом для детекции SNV, так как точность достигает практически

100%. На первом этапе необходимо очистить и амплифицировать большое количество копий ДНК, которые нужны для синтеза второй цепи в присутствии специфических праймеров, термостабильной полимеразы, смеси дезоксинуклеотидов (стандартных мономеров ДНК) и дидезоксинуклеотидов, содержащих флуоресцентную метку, которая позволяет впоследствии визуализировать результаты. Дидезоксинуклеотиды вызывают случайное необратимое прекращение синтеза, создавая копии молекул ДНК разной длины. После завершения реакции продукты синтеза разделяют с помощью капиллярного электрофореза, и метка, прикрепленная к последним нуклеотидам, позволяет установить изначальный порядок нуклеотидов. Метод точный, надежный и простой в исполнении, но довольно медленный и трудоемкий [10].

Секвенирование нового поколения предполагает подготовку библиотеки. Для этого ДНК случайным образом фрагментируется ультразвуком или ферментативной обработкой. После этого происходит формирование кластеров для создания более сильного сигнала флуоресценции. Третий этап – непосредственное секвенирование. На последнем этапе происходит анализ данных с помощью биоинформатических инструментов. Метод очень эффективный, чувствительный и позволяет получить полногеномные данные, однако требует наличия хорошего технического оснащения [11].

Таким образом, однонуклеотидные вариации являются фундаментальным источником генетического разнообразия у человека и играют важную роль в развитии заболеваний. Понимание причин возникновения SNV и методов их обнаружения в клетках человека имеет решающее значение для персонализированной медицины, генетических исследований и диагностики заболеваний.

### **Библиографические ссылки**

1. *Washington M.T.* DNA Polymerase Fidelity: Beyond Right and Wrong // *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2016. Vol. 24, № 11. P. 1855-1856.
2. Genome-wide survey of the prevalence and evolutionary forces acting on human nonsense SNPs / B. Yngvadottir [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. Vol. 84, iss. 2. P. 224-234.
3. Evaluation of the functional effects of genetic variants—missense and nonsense SNPs, indels and copy number variations—in the gene encoding human deoxyribonuclease I potentially implicated in autoimmunity / M. Ueki [et al.] // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. P. 13660-13668.
4. Genetic variation and sickle cell disease severity / J.K. Kirkham [et al.] // *JAMA Netw. Open.* 2023. Vol. 6, iss. 10. P. e2337484.

5. Polymorphisms in the glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) gene are associated with the risk of coronary artery disease in chinese han patients with type 2 diabetes mellitus: A Case-Control Study / X. Ma [et al.] // J. Diabetes Res. 2018. Vol. 2018. P. e1054192.
6. *Schacht J.P.* Intermediate cannabis dependence phenotypes and the FAAH C385A variant: an exploratory analysis // Psychopharmacology (Berl.). 2009. Vol. 203, iss. 3. P. 511-517.
7. *Mao X.* The application of single nucleotide polymorphism microarrays in cancer research // Curr. Genomics. 2007. Vol. 8, iss. 4. P. 219-228.
8. How to Choose Suitable SNP Genotyping Method - CD Genomics [Electronic resours]. URL: <https://www.cd-genomics.com/how-to-chose-suitable-snp-genotyping-method.html> (data of access: 06.04.2024).
9. Allele-specific PCR with a novel data processing method based on difference value for single nucleotide polymorphism genotyping of ALDH2 gene / Q. He [et al.] // Talanta. 2020. Vol. 220. P. 121432 - 121437.
10. *Pareek C.S.* Sequencing technologies and genome sequencing // J. Appl. Genet. 2011. Vol. 52, iss. 4. P. 413-435.
11. *Levy S.E.* Next-Generation Sequencing Strategies // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2019. Vol. 9, iss. 7. P. 25791-25799.