

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042541**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.27

(21) Номер заявки
202192485

(22) Дата подачи заявки
2021.10.11

(51) Int. Cl. **C12Q 1/6813** (2006.01)
C12Q 1/6827 (2006.01)
C12Q 1/6844 (2006.01)
C12Q 1/686 (2006.01)
C12Q 1/682 (2006.01)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПА ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗАННОГО С АЦЕТИЛИРОВАНИЕМ КСЕНОБИОТИКОВ

(31) 2020137412

(32) 2020.11.13

(33) RU

(43) 2022.05.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ ИРКУТСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ;
ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ПРОБЛЕМ ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И
РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Огарков Олег Борисович,
Перетолчина Надежда Павловна,
Малов Сергей Игоревич, Орлова
Елизавета Андреевна, Степаненко
Лилия Александровна, Хромова
Полина Андреевна (RU)**

(74) Представитель:
Шестакова Т.А. (RU)

(56) CN-A-102876775
HEIN David W. et al. TaqMan Real Time-Polymerase Chain Reaction Methods for Determination of Nucleotide Polymorphisms in Human N-Acetyltransferase-1 (NAT1) and -2 (NAT2). Current Protocols in Toxicology, 2005, doi: 10.1002/0471140856.tx0415s22, реферат RU-C1-2445372
GRA O.A. et al. Genetic Polymorphism of GST, NAT2, and MTRR and Susceptibility to Childhood Acute Leukemia. Molecular Biology, 2008, Vol. 42, No. 2, pp. 187-197, реферат

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к фармагенетике, молекулярной диагностике и касается олигонуклеотидных праймеров, флуоресцентных ДНК-зондов и способа определения генотипа человека, связанного с быстрым и медленным ацетилизацией ксенобиотиков. Генотипирование ариламин-N-ацетилтрансферазы осуществляют путем детекции tag SNP rs1495741 с использованием специфических праймеров NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA и NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC и двух флуоресцентно-меченых зондов, содержащих участки "замкнутых нуклеотидов", NAT2 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT - BHQ2 и 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT - RTQ1 в режиме амплификации, а именно 1 цикл 95° - 5 мин, 40 циклов 95° - 10 с, 65° - 15 с, 72° - 15 с. Оценку результатов проводят регистрацией сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G путем детекции сигнала между 18-38 циклами.

B1

042541

042541

B1

Изобретение относится к медицине, а именно к фармакогенетике, молекулярной диагностике, и касается олигонуклеотидных праймеров, флуоресцентных ДНК-зондов и способа определения генотипа человека, связанного с быстрым и медленным ацетилированием ксенобиотиков.

Ариламин-N-ацетилтрансфераза 2 (NAT2) - фермент второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, осуществляющий ацетилирование ариламинов и гидразинов. Фермент синтезируется во всех клетках организма, но его наибольшая активность наблюдается в клетках печени, где завершается детоксикация веществ. Ген фермента локализован на 8 хромосоме (8p22) и имеет ряд полиморфизмов, комбинация которых привела к существованию двух гаплотипов, ассоциированных с медленным или быстрым ацетилированием субстрата (Hein, David W. "N-acetyltransferase SNPs: emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 5.4 (2009): 353-366). Сочетание аллельных вариантов гена NAT2 приводит к тримодальному распределению популяции на быстрых, медленных и промежуточных ацетиляторов.

NAT2 участвует в ацетилировании ароматических и гетероциклических аминов, которые содержатся в табачном дыме, загрязнителях окружающей среды, продуктах горения, эндогенных соединениях (серотонин, гистамин, дофамин), некоторых лекарственных веществах, а также выделяются в атмосферный воздух при производстве красок, резине, каменноугольного газа.

В медицине наибольшее практическое значение имеет оценка скорости ацетилирования лекарственных препаратов. В исследованиях ряда ученых об эффективности и безопасности использования изониазида для лечения больных с туберкулезом показана зависимость частоты нейро- и гепатотоксического эффекта препарата от генотипа: медленные ацетиляторы имели более высокие риски развития токсических эффектов при применении изониазида (Ho, Hsin-Tien, et al. "The NAT2 tag SNP rs1495741 correlates with the susceptibility of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity." *Pharmacogenetics and Genomics* 23.4 (2013): 200-207). Кроме того, медленные ацетиляторы имеют предрасположенность к развитию лекарственной системной красной волчанке при длительном лечении антиаритмическими препаратами (прокаинамид, гидралазин), гематологической токсичности при применении дапсона, токсического эпидермального некролиза при лечении инфекционных заболеваний антибиотиками группы сульфаниламидов. Быстрые ацетиляторы, по сравнению с медленными, в меньшей степени подвержены токсическим эффектам, но эффективность применения лекарственных средств у данной группы снижена в связи с быстрым метаболизмом и выведением из организма действующего вещества, что приводит к уменьшению времени его воздействия на клетки-мишени. Определение генотипа гена NAT2 позволяет назначать лекарственные средства в соответствии с индивидуальными особенностями пациента, что является актуальным для развития персонализированной медицины. Кроме этого, замедление скорости ацетилирования обуславливает повышенный риск развития рака из-за снижения дезактивации ароматических аминов. В ряде исследований показана связь предрасположенности к онкологическим заболеваниям, таким как рак груди и рак мочевого пузыря, с генотипом NAT2, особенно среди курильщиков (Umberto Gelatti et al. "N-Acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, cigarette smoking and hepatocellular carcinoma: A case-control study". *Int. J. Cancer*: 115, (2005):301-306. Таким образом, генетически детерминированные особенности биотрансформации ксенобиотиков определяют индивидуальные реакции организма на разнообразные токсические вещества и лекарственные препараты.

Известно несколько методов генотипирования гена NAT2, основанные на определении семи SNP: rs1801279 (G191A), rs1041983 (C282T), rs1801280 (T341C), rs1799929 (C481T), rs1799930 (G590A), rs1208 (A803G), rs1799931 (G857A) [Bolt H.M., Selinski S., Dannappel D., Blaszkewicz M., Golka K. Re-investigation of the concordance of human NAT2 phenotypes and genotypes. *Arch Toxicol.* 2005;79:196-200].

Известен способ секвенирование второго экзона гена NAT2 и определение генотипа с использованием алгоритма классификации NAT2PRED (Kuznetsov, Igor B., Michael McDuffie, and Roxana Moslehi. "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186). Однако применение данного способа ограничено в медицинской практике в связи со сложностью пробоподготовки, длительностью выполнения теста и высокой стоимостью оборудования и наборов.

Известен способ генотипирования, основанный на анализе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК (полимеразная цепная реакция в реальном времени) [Miller, M.A., Grigg, M.E., Kreuder, C., James, E.R., Melli, A.C., Crosbie, P.R., Jessup, D.A., Boothroyd, J.C., Brownstein, D., Conrad, P.A., 2004. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int. J. Parasitol.* 34,275-284.]. Недостатком способа является его время- и трудозатратность, так как он включает в себя проведение двух полимеразных цепных реакций и использование 7 рестрикционных ферментов с последующей детекцией в агарозном геле.

Известен способ определения полиморфизма гена NAT2 (rs1801280) в комбинации с генами других ферментов биотрансформации с помощью метода гибридизации на биологическом чипе. Разработана диагностическая система "ПФ-Биочип" (Рег. Уд. № ФС 01262006/5317-06) для выявления и диагностики предрасположенности к развитию онкологических заболеваний и для определения индивидуальной чувствительности к некоторым лекарственным препаратам (5-фторурацилу, метотрексату, омепразолу и др.). К недостаткам способа относится длительность анализа (Gra, O.A. et al. "Genetic polymorphism of

GST, NAT2, and MTRR and susceptibility to childhood acute leukemia." *Molecular Biology* 42.2 (2008): 187). Кроме того, полиморфизм rs1801280 часто определяют в комбинации с rs1041983 для более точного предсказания генотипа NAT2.

Наиболее близким способом является "Набор и метод для обнаружения полиморфизма гена NAT2 с использованием флуоресцентной количественной ПЦР в реальном времени" (Пер. уд. № WO/2014/036924). Для обнаружения ключевого однонуклеотидного полиморфизма (SNP) используют набор олигонуклеотидных праймеров с последующим проведением флуоресцентной количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Перечисленные выше способы обладают рядом недостатков - высокая трудозатратность и стоимость наборов, длительность выполнения теста, что затрудняет их использование в практической медицине.

Техническим результатом предлагаемого способа является сокращение времени определения, а также повышение чувствительности и специфичности при доступности оборудования и реактивов.

Новым в предлагаемом способе является то, что генотипирование арилами-*N*-ацетилтрансферазы осуществляют на основании детекции tag SNP rs1495741 с использованием специфических праймеров NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA и NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC и двух флуоресцентно-меченых зондов, содержащих участки "замкнутых нуклеотидов" NAT2 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT - BHQ2 и 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT - RTQ1 в режиме амплификации, а именно 1 цикл 95° - 5 мин, 40 циклов 95° - 10 с, 65° - 15 с, 72° - 15 с.

Новым является также то, что оценку результатов проводят регистрацией сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G путем детекции сигнала между 18-38 циклами.

Для выявления ключевого однонуклеотидного полиморфизма (tag SNP) rs1495741 были использованы сконструированные авторами синтетические олигонуклеотидные праймеры и ДНК-зонды:

1) праймеры NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA и NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC;

2) флуоресцентно-меченые зонды NAT2 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT - BHQ2 и 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT - RTQ1.

Достоинство предлагаемого способа в том, что определение генотипа NAT2 включает выделение ДНК из крови, слюны и других биологических образцов, проведение полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) с разработанными олигонуклеотидными праймерами и флуоресцентно-мечеными зондами в режиме амплификации (1 цикл 95°C - 5 мин; 40 циклов 95°C - 10 с, 65°C - 15 с, 72°C - 15 с) и оценку результата. Оценка результата проводят путем регистрации сигнала флуоресценции по каналам FAM (520 нм) и R6G (557 нм) путем детекции сигнала между 18-38 циклами. Проведенный анализ патентной и научной литературы показал, что предложенный способ отличается от других решений в данной области. Так праймеры и зонды, необходимые для детекции гаплотипов NAT2 с помощью ПЦР-РВ, не были найдены. По сравнению с используемыми методами ПЦР-ПДРФ, гибридизации на биочипе и секвенирования сконструированные праймеры и ДНК-зонды позволяют быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью определить генотип NAT2 и тип ацетилирования на основании SNP в позиции 18415371 хромосомы 8: A;A - медленный, A;G - промежуточный, G;G - быстрый. Предлагаемый способ отличается высокой скоростью проведения, доступностью оборудования и реактивов для его проведения и высокой чувствительностью и специфичностью. Было показано, что результаты генотипирования с помощью данного SNP коррелируют с типом ацетилирования, который был предсказан на основании семи SNP в последовательности второго экзона гена NAT2 (Selinski, Silvia, et al. "Genotyping NAT2 with only two SNPs (rs1041983 and rs1801280) outperforms the tagging SNP rs1495741 and is equivalent to the conventional 7-SNP NAT2 genotype." *Pharmacogenetics and genomics* 21.10 (2011): 673-678.).

Конструирование праймеров и зондов осуществлено в ручном режиме исходя из структуры описания SNP rs1495741 в референсных геномах (нуклеотидной последовательности справа и слева от позиции мишени) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1495741>].

NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3';

NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3';

Зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-3' - BHQ2;

Зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' - RTQ1.

Химический синтез праймеров и зондов осуществляют по нашему заказу в НПФ "Синтол" (Москва), там же определяют концентрацию олигонуклеотидов. Для работы авторы используют разведение олигонуклеотидных праймеров и зондов из лиофильно-высушенного материала. Зонд 1 мечен флуорофором R6G по 5'-концу и гасителем флуоресценции BHQ2 по 3'-концу. Детекцию сигнала проводили по "желтому" (R6G/Yellow) каналу (длина волны 557 нм). Зонд 2 мечен флуорофором FAM по 5'-концу и гасителем флуоресценции RTQ1 по 3'-концу. Детекцию сигнала проводили по "зеленому" (FAM/Green) каналу детекции в термочиклере RotorGene6000 (длина волны 520 нм).

Указанные праймеры были подобраны исходя из анализа структуры гена в диапазоне 200 п.н. во-

круг tag SNP rs1495741.

Сопоставительный анализ предлагаемого способа и прототипа показывает, что предлагаемый способ отличается тем, что генотипирование ариламиин-N-ацетилтрансферазы осуществляют путем детекции tag SNP rs1495741 с использованием специфических праймеров NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA и NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC и двух флуоресцентно-меченных зондов, содержащих участки "замкнутых нуклеотидов": NAT2 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT - BHQ2 и 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT - RTQ1 в режиме амплификации, а именно 1 цикл 95° - 5 мин, 40 циклов 95° - 10 с, 65° - 15 с, 72° - 15 с, а оценку результатов проводят регистрацией сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G путем детекции сигнала между 18-38 циклами, что соответствует критерию "новизна".

Предлагаемый способ позволяет быстро и с высокой чувствительностью и специфичностью определить генотип NAT2 и тип ацетилирования в исследуемом материале. Преимуществом предложенного способа является сокращение времени исследования, простота и автоматизированная интерпретация результатов, доступность способа для клинических лабораторий.

Способ осуществляют следующим образом.

Выделяют ДНК из крови, слюны или других биологических образцов. Материал помещают в пробирку с винтовой крышкой. Выделение ДНК производят набором ДНК-сорб-В согласно протоколу производителя (Интерлабсервис, Москва). Осуществляют идентификацию генотипа NAT2. К 12,5 мкл пробы добавляют 12,5 мкл смеси, содержащей буфер для полимеразной цепной реакции, праймер NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3', NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3', зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-3' - BHQ2, зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' - RTQ1, сульфат магния, смесь четырех 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, TaqF-полимераза. Конечный объем реакционной смеси - 25 мкл. Проводят полимеразную цепную реакцию с детекцией в реальном времени с разработанными олигонуклеотидными праймерами и флуоресцентно-мечеными зондами в режиме амплификации. Режимы амплификации ДНК на амплификаторе CFX БиоРад: 1 цикл 95°C - 5 мин; 40 циклов 95°C - 10 с, 65°C - 15 с, 72°C - 15 с. Оценку результата проводят путем регистрации сигнала флуоресценции по каналам FAM (520 нм) и R6G (557 нм) путем детекции сигнала между 18-38 циклами. Предложенный способ позволяет быстро, с высокой специфичностью выявить аллель 1495741A, связанный с медленным ацетилированием ксенобиотиков, и аллель 1495741G, связанный с быстрым ацетилированием ксенобиотиков. Присутствие обоих аллелей 1495741A и 1495741G оценивают как генотип, связанный с умеренной скоростью ацетилирования.

Примеры конкретного выполнения способа

Пример 1. Производили соскоб буккального эпителия с внутренней стороны щеки у добровольца А. Материал помещали в пробирку с винтовой крышкой. Выделение ДНК производили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Москва) согласно протоколу производителя. К 12,5 мкл пробы добавили 12,5 мкл смеси, содержащей буфер для ПЦР; праймер NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3'; NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3'; зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-3' - BHQ2; зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' - RTQ1; сульфат магния; смесь четырех 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов; TaqF-полимераза. Конечный объем реакционной смеси - 25 мкл. При регистрации сигнала наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции по FAM между 18-38 циклами, что свидетельствует о наличии двух аллелей 1495741A. Таким образом, результат оценивается как генотип, связанный с медленной скоростью ацетилирования субстрата.

Для подтверждения полученного результата образец был отправлен в ЗАО "Евроген" для секвенирования с второго экзона NAT2. Интерпретация результатов проводилась с использованием алгоритма классификации NAT2PRED (Kuznetsov I.B., McDuffie M., Moslehi R., "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186.). В результате был подтвержден генотип с медленным типом ацетилирования.

Пример 2. Производили соскоб буккального эпителия с внутренней стороны щеки у добровольца П. Материал помещали в пробирку с винтовой крышкой. Выделение ДНК производили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Москва) согласно протоколу производителя. К 12,5 мкл пробы добавили 12,5 мкл смеси, содержащей буфер для ПЦР; праймер NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3'; NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3'; зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-3' - BHQ2; зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' - RTQ1; сульфат магния; смесь четырех 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов; TaqF-полимераза. Конечный объем реакционной смеси - 25 мкл. При регистрации сигнала наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции по R6G между 18-38 циклами, что свидетельствует о наличии двух аллелей 1495741G, ассоциированных с быстрой скоростью ацетилирования.

Для подтверждения полученного результата образец был отправлен в ЗАО "Евроген" для секвенирования с второго экзона NAT2. Интерпретация результатов проводилась с использованием алгоритма классификации NAT2PRED (Kuznetsov, Igor B., Michael McDuffie, and Roxana Moslehi. "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186.). В результате был подтвержден генотип с быстрым типом ацетилирования.

Пример 3. Производили соскоб буккального эпителия с внутренней стороны щеки у добровольца К. Материал помещали в пробирку с винтовой крышкой. Выделение ДНК производили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Москва) согласно протоколу производителя. К 12,5 мкл пробы добавили 12,5 мкл смеси, содержащей буфер для ПЦР; праймер NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3'; NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3'; зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-3' - BHQ2; зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' - RTQ1; сульфат магния; смесь четырех 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов; TaqF-полимераза. Конечный объем реакционной смеси - 25 мкл. При регистрации сигнала наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции по R6G и FAM между 18-38 циклами, что свидетельствует о наличии двух аллелей 1495741G и 1495741A. Таким образом, генотип NAT2 ассоциирован с умеренной скоростью ацетилирования субстратов.

Для подтверждения полученного результата образец был отправлен в ЗАО "Евроген" для секвенирования с второго экзона NAT2. Интерпретация результатов проводилась с использованием алгоритма классификации NAT2PRED (Kuznetsov, Igor B., Michael McDuffie, and Roxana Moslehi. "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186). В результате был подтвержден генотип с промежуточным (умеренным) типом ацетилирования.

Пример 4. Апробацию предложенного способа проводили у 50 человек, добровольно принявших участие в исследовании. Информированное согласие было получено от каждого участника исследования, а проведение настоящей работы было одобрено комитетом по этике Иркутского государственного медицинского университета. Генетический материал (буккальный эпителий) был исследован двумя способами: секвенирование второго экзона NAT2, которое проводилось компанией "Евроген", и по предлагаемому способу, которая выполнялась на базах ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ и ГБОУ ВПО ИГМУ. При оценке результатов предлагаемого способа было выявлено 29 проб с медленным типом ацетилирования (A;A), 16 с промежуточным (A;G) и 5 проб с быстрым (G;G). В дальнейшем ДНК была отправлена на секвенирование второго экзона NAT2 на базе компании ЗАО "Евроген". Определение генотипа проводилось с использованием алгоритма классификации NAT2PRED. ([Kuznetsov, Igor B., Michael McDuffie, and Roxana Moslehi. "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186). В результате только два образца были классифицированы неверно: 1 образец имел генотип с промежуточным типом ацетилирования и 1 образец с медленным типом ацетилирования. Таким образом, чувствительность и специфичность предлагаемого метода относительно референсного исследования составили 96,6% и 95,2% соответственно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ определения генотипа человека, связанного с ацетилированием ксенобиотиков путем обнаружения полиморфизма гена ариламин-N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) с использованием флуоресцентной количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, отличающийся тем, что генотипирование NAT2 осуществляют путем детекции tag SNP rs1495741 в позиции 18415371 хромосомы 8 с использованием специфических праймеров NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3' и NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3' и двух флуоресцентно-меченых зондов 5-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT 3'-BHQ2 и 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' - RTQ1 в режиме амплификации: 1 цикл 95° - 5 мин, 40 циклов 95° - 10 с, 65° - 15 с, 72° - 15 с, при этом оценивают результаты сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G между 18-38 циклами амплификации, и при регистрации экспоненциального роста флуоресценции по каналу FAM судят о наличии двух аллелей 1495741A и определяют генотип NAT2, связанный с медленной скоростью ацетилирования ксенобиотиков, при регистрации экспоненциального роста флуоресценции по каналу R6G судят о наличии двух аллелей 1495741G и определяют генотип NAT2, связанный с быстрой скоростью ацетилирования ксенобиотиков, а при регистрации экспоненциального роста флуоресценции по каналам R6G и FAM судят о наличии обоих аллелей 1495741A и 1495741G и определяют генотип NAT2, связанный с умеренной скоростью ацетилирования ксенобиотиков.

