

## Sposób ustalania płci

Przedmiotem wynalazku jest szybki sposób weryfikacji płci na poziomie DNA, z wykorzystaniem techniki analizy profilu topnienia specyficznych fragmentów DNA uzyskanych na bazie DNA pochodzącego z próbek ludzkiego materiału biologicznego, zwłaszcza wchodzących w skład kolekcji biobanków, archiwów tkankowych, oraz w badaniach prenatalnych i badaniach prowadzonych przez laboratoria kryminalistyczne.

Amelogenina (AMGXY) jest głównym białkiem macierzy pozakomórkowej w zawiązku zęba. Ludzkie sekwencje kodujące amelogeninę obecne są na krótkim ramieniu chromosomu X (AMG; Xp) oraz blisko centromeru na chromosomie Y (ang. AMGL - amelogenin like sequence). Homologia sekwencji genu amelogeniny na obu chromosomach płci X i Y wynosi ok. 90%. Gen *AMELY* jest zlokalizowany na chromosomie Y, a jego sekwencja różni się znacznie od sekwencji genu *AMELX*, leżącego na chromosomie X. Koduje amelogeninę będącą głównym białkiem macierzy pozakomórkowej zawiązków zębów. Z opisanych powodów gen ten może być wykorzystywany w metodach służących ocenie płci.

Gen *SRY* jest zlokalizowany na chromosomie Y i nie posiada swego odpowiednika na chromosomie X. Z tego powodu może być wykorzystywany w metodach służących ocenie płci. Koduje białko TDF (ang. testis-determining factor).

Znana jest przydatność oceny zmienności sekwencji genu dla amelogeniny, która może być wykorzystywana w konwencjonalnych reakcjach PCR dla określenia płci dawcy DNA poddawanego badaniom genetycznym. Dotychczas zaproponowane metody opierają się zazwyczaj o czasochłonną reakcję PCR i następnie wydłużającą czas niezbędny dla wykonania analizy elektroforezową uzyskanych produktów PCR. Metody te nie są pozbawione również innych wad związanych z etapem analizy elektroforetycznej, w szczególności związanych z wysokim ryzykiem błędów wynikających z konieczności nanoszenia próbek do analizy, powtarzalności procedur przygotowania żelu będącego miejscem wykonania rozdziału elektroforetycznego, właściwego zarchiwizowania wyniku elektroforezy i oceny wielkości uzyskanych produktów PCR, mających znaczenie w analizie. Inną stosowaną metodą jest reakcja PCR z wykorzystaniem znakowanych sond - składnik ten znacząco podnosi koszt samej reakcji.

Celem wynalazku jest dostarczenie metody ustalania płci dawcy na podstawie próbki materiału genetycznego pobranej od dawcy, która to metoda pozbawiona była opisanych powyżej wad, a w szczególności pozwalała na uzyskanie pewnego wyniku w stosunkowo szybkim czasie, bez konieczności ponoszenia wysokich kosztów materiałowych.

Nieoczekiwanie określony powyżej cel został osiągnięty w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób określony w zastrzeżeniach.

Zaproponowane zgodnie z wynalazkiem wykorzystanie metody LRM (Low Resolution Melting) w ocenie płci osób poddawanych badaniom genetycznym, znacząco ułatwia wykonanie takiego badania. Sposób według wynalazku uniezależnia badacza od szeregu możliwych błędów charakteryzujących metodę w oparciu o rozdział elektroforetyczny produktów PCR i jest znacznie tańszy od alternatywnych metod z wykorzystaniem znakowanych sond genetycznych.

Nieoczekiwanie w toku eksperymentów, które doprowadziły do uzyskania przedmiotowego wynalazku udało się uzyskać primery reakcji PCR, które pozwalają na łatwe rozróżnienie produktów specyficznych dla obu płci. Ponadto nieoczekiwanie okazało się, że w przypadku prowadzenia reakcji PCR w warunkach według wynalazku, specyficzny produkt uzyskiwany na matrycy pochodzącej z chromosomu Y dominuje ilościowo w mieszaninie produktów po amplifikacji. Ten nieoczekiwany efekt dodatkowo poprawia czułość metody według wynalazku.

Dzięki temu możliwe jest wyeliminowanie stosowania relatywnie drogich odczynników zwykle wykorzystywanych w reakcji HRM (LCGreen, EvaGreen), które z powodzeniem udało się zastąpić znacznie tańszym barwnikiem SYBR Green, co znacząco obniża koszty wykonania analizy. Było to możliwe ze względu na zaprojektowane przez nas primery reakcji PCR, które nieoczekiwanie pozwalają na uzyskanie produktów specyficznych dla obu płci, przy czym różnica w wielkości produktów jest na tyle duża, że z powodzeniem można wykorzystać tańszy barwnik interkalujący z mniejszą wydajnością z DNA z zachowaniem właściwej dyskryminacji płci badanych próbek, pochodzących od dawców DNA. Stosowana w opisie nazwa analizy LRM nawiązuje do tego, że można ją wykonać na każdym konwencjonalnym aparacie do PCR w czasie rzeczywistym. Pozostawiona jest również możliwość stosowania rozdziału elektroforetycznego jako metody analitycznej.

Zaproponowane w opisanej poniżej przykładowej realizacji wynalazku warunki reakcji pozwalają na łatwą analizę wyniku na podstawie uzyskanych profili topnienia, które nie wymagają stosowania wysokiej rozdzielczości układu pomiarowego.

#### Przykład 1. Oznaczanie płci metodą według wynalazku

Wykorzystano parę primerów specyficzną dla genu amelogeniny leżącego na chromosomie Y, oraz parę primerów dla genu *ABCG2*, który występuje zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet (wewnętrzna kontrola reakcji).

W trakcie weryfikowania czułości i specyficzności metody na 3847 różnych izolatach DNA pochodzenia ludzkiego uzyskano 3665 poprawnych wyników (95,27%), 175 wątpliwych, wskazujących na konieczność zastosowania alternatywnej metody np. *SRY* (4,54%) oraz 7 wyników błędnych, co stanowi zaledwie 0,18%.

Jednocześnie opracowana została alternatywna metoda w oparciu o wykrywanie genu *SRY* (charakterystycznego dla mężczyzn), również w oparciu o metodę LRM, ewentualnie z możliwością stosowaniu rozdziału elektroforetycznego.

#### Warunki reakcji PCR dla układu z wykorzystaniem genu *SRY* albo *AMELY*

Platforma sprzętowa to albo CFX384 albo CFX96 (BioRad, USA). Reakcje można wykonać zarówno na płytkach PCR o przejrzystych dołkach albo białych. Reakcja w objętości 15  $\mu$ L, z 0,5 ng DNA, 2 $\times$  iQ SYBR Green Supermix (BioRad, USA) oraz po 0,20  $\mu$ M każdego z primerów reakcji PCR.

Warunki termiczne reakcji:

*AMELY* 95°C - 3 minuty, (95°C - 20 s, 60°C - 25 s, 72°C - 40 s) x 50

*SRY* 95°C - 3 minuty, (95°C - 30 s, 60°C - 30 s, 72°C - 45 s) x 50

Primery do *AMELY*:

F1 TCTCTAATTGAACTCTTCCCCTTT (Sekw. Id. Nr :1) (F1 i R1 - produkt kontrolny, dla mężczyzny i kobiety - gen *ABCG2*, wielkość produktu - 181 pz)

R1 TGAAGAAAGTAACAGCATTTTCTGA (Sekw. Id. Nr: 2)

F2 CTTTGACAGTAGCAGAACTGGC (Sekw. Id. Nr: 3) (F2 i R2 - produkt tylko dla mężczyzny, gen *AMELY*, wielkość produktu - 287 pz)

R2 CCTTCATTTTGGGTGAGCAT (Sekw. Id. Nr: 4)

Primery do *SRY*:

F3 ATAGCATGTGTTGGAGGGAAAA (Sekw. Id. Nr: 5) (F3 i R3 - produkt kontrolny, dla mężczyzny i kobiety - gen *ABCG2*, wielkość produktu - 413 pz)

R3 ATTGGTATCACTGTCCTTACAAG (Sekw. Id. Nr: 6)

F4 TACAGGCCATGCACAGAGAG (Sekw. Id. Nr: 7) (F4 i R4 - produkt tylko dla mężczyzny, gen *SRY*, wielkość produktu - 179 pz)

R4 TCTTGAGTGTGTGGCTTTCG (Sekw. Id. Nr: 8).

Na figurach 1 i 2 przedstawiono wyniki analizy elektroforetycznej uzyskanych produktów PCR wykonanej w celach porównawczych.

W metodzie według wynalazku produkty amplifikacji poddawano bezpośrednio analizie termicznej (krzywe topnienia).

Uzyskane profile topnienia zostały przedstawione na fig. 3-4.

Warunki wykonania analizy krzywej topnienia (LRM) dla układu z wykorzystaniem genu *SRY* albo *AMELY*:

90°C - 1 minuta, 40°C - 1 minuta, krzywa topnienia z przeskokiem o 0,5°C (niska rozdzielczość) w zakresie od 65°C do 95°C.