

УДК 577

М.А.Вострухина (5 курс, каф. БФ), В.И.Евтушенко, д.б.н., зав. лаб. (ЦНИРРИ)

МНОЖЕСТВЕННЫЙ ПАРАЛЛЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОМА

Изучение генома – один из самых интересных разделов молекулярной биологии. Он включает структурную часть – секвенирование генома, и функциональную – изучение экспрессии генов. Считается, что существует примерно 100-150 тысяч генов, из которых в разных типах клеток активны только 20-40 тысяч. Анализ экспрессии генов до середины 90-х годов осуществлялся, как правило, с одним геном в одном эксперименте. Появление метода множественного параллельного анализа экспрессии (МПАЭ, “микроэррейз”) позволило работать сначала с несколькими сотнями генов, затем с тысячей и далее с десятками тысяч генов одновременно. Так, на 1 микрочип можно расположить все известные гены человека, используя синтез олигонуклеотидов непосредственно на носителе.

С помощью технологии МПАЭ стало возможным на одном фильтре или слайде в одном эксперименте анализировать десятки тысяч генов с одной меченой пробой в одних гибридизационных условиях, определять молекулярные профили различных тканей, относительный уровень транскриптов экспрессирующихся в них генов, находить кластеры коэкспрессирующихся генов, выделять подвиды, например, первичных опухолей на основании различий в профилях экспрессирующихся в них генов.

Технология МПАЭ включает в себя цепь взаимосвязанных методов: получение фрагментов генов, изучение экспрессии которых входит в задачи исследователя (в качестве последовательностей изучаемых генов могут использоваться различные участки геномной и комплементарной ДНК, клоны геномных библиотек, продукты ПЦР, полные копии ДНК известных генов (ORF), экспрессирующиеся последовательности (EST), отдельные смысловые части или целые домены генов, экзоны геномной ДНК, а также плазмидные векторы, несущие вставки геномных последовательностей; изготовление мембран; иммобилизация генетического материала; получение из ткани-мишени выделенной РНК, ее очищение, синтез кДНК по матрице выделенной РНК, мечение кДНК с использованием радиоактивной или флуоресцентной метки; гибридизация фрагментов генов, иммобилизованных на мембране, с меченой кДНК в растворе; детекция гибридизационного сигнала; математический анализ и обработка результатов.

Цель данной работы – налаживание всей цепи методов и инструментальной базы технологии множественного параллельного анализа экспрессии генов, иммобилизованных на мембранах. Для нанесения ДНК были выбраны мембраны Duralon-UV (Stratagene) и Tropilon-Plus (Tropix), отобраны и наработаны в препаративных количествах олигонуклеотиды и ПЦР-продукты, фрагменты интересующих нас как генов домашнего хозяйства, так и тканеспецифических генов (для амплификаций выбраны кДНК, синтезированные на матрице мРНК, выделенные из нормальной ткани предстательной железы, нормальной и опухолевой тканей почки человека), изготовлены (напечатаны) мембраны для последующей работы. При проведении гибридизационных экспериментов на основе хемилюминесценции были использованы системы мечения на основе биотина и дигоксигенина. Метили контрольную смесь фрагментов кДНК клонированных онкогенов (Ets 1, 2), анти-онкогенов (p-53 a,b), простат-специфического антигена PSA (pSeqTag2),

фактора некроза опухоли (TNF α), и транскрипционного фактора (с-мус). По окончании гибридизации проводили жёсткую отмывку мембраны с последующей иммунологической детекцией, инкубацией мембраны с хемилюминесцентным субстратом и автордиографией в течение 30, 60, 90 минут или 16 часов. Результат гибридизации оценивали визуально. Отрицательные контроли подтверждены. Все повторно нанесенные на мембрану олигонуклеотиды имеют одинаковые гибридизационные сигналы.

Таким образом, в качестве модельного эксперимента успешно осуществлен весь цикл метода множественного параллельного анализа экспрессии генов:

- отработана техника изготовления мембран с иммобилизованными фрагментами генов с помощью выбранного печатающего устройства (прибор Glass Slide Microarrayer, Replicator Pins 8 VP478 с восемью штифтами);
- экспериментально подобрана мембрана для эффективного нанесения и иммобилизации ДНК – Duralon-UV;
- отобрано 60 генов для последующего экспрессионного анализа и получены в препаративных количествах фрагменты этих генов с использованием ПЦР амплификации и олигонуклеотидного синтеза;
- изготовлены мембраны с иммобилизованными ПЦР- и олигонуклеотидными фрагментами отобранных генов;
- выбран оптимальный способ нерадиоактивного мечения кДНК-мишени и хемилюминесцентной детекции гибридизационного сигнала на основе дигоксигенина;
- проведен ряд гибридизаций изготовленных мембран с использованием в качестве меченой ДНК-мишени смеси клонированных клеточных генов, получен четкий гибридизационный сигнал.