

УДК 577

Н.В.Пономарева (5 курс, каф. БФ), М.С.Вонский, к.б.н.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ОТ-ПЦР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Задача настоящей работы состояла в отработке метода оценки экспрессии генов в лейкоцитах с применением ОТ-ПЦР. Существует два основных пути контроля экспрессии генов – регуляция на уровне транскрипции и регуляция на уровне трансляции. Метод ОТ-ПЦР позволяет оценивать уровень экспрессии гена по накоплению соответствующей мРНК в клетках, т.е. оценивать экспрессию, регулирующую на уровне транскрипции.

В работе были использованы следующие методики.

Выделение мРНК из лейкоцитов. Клетки лейкоцитов осаждали из препарата ЭДТА-крови центрифугированием, при этом эритроциты вскрывали при помощи осмотического шока и отмывали от гемоглобина. С помощью кислого фенола (рН = 6.0) из лейкоцитов выделяли цитоплазматическую фракцию мРНК. Экстракция фенолом с низким рН приводит к тому, что ДНК уходит из водной фазы. После депротеинизации фенолом (рН = 8.0) и смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (12:12:1) остатки фенола удаляли хлороформом. Удаление даже следовых количеств фенола важно, т.к. он является сильным ингибитором ферментных реакций. Для окончательного осаждения РНК использовали 96% этиловый спирт. Препарат обрабатывали ДНКазой, чистоту и количество мРНК оценивали спектрофотометрически.

Синтез кДНК. С помощью универсальных гексамеров и обратной транскриптазы на матрице выделенной РНК синтезировали кДНК. Для обеспечения однородности проводимой реакции использовали коммерческий набор (ImProm-II, Reverse Transcriptase, Promega).

ПЦР реакция. Реакцию ставили на матрице полученной кДНК, в качестве мишени для праймеров были выбраны фрагменты генов актина, эстрогенных рецепторов (ER), инсулинового рецептора (INR), антиапоптозные гены (Bcl2), маркеры клеточной пролиферации Ki67, гены, индуцирующие апоптоз (P53), гены андрогенных рецепторов (AR), прогестеронового рецептора (PGR), факторы некроза опухолей – α (TNF), трансформирующий Фактора роста (ФР) β (TGF), инсулиноподобный ФР типа 1a и 1b (IGF), основной ФР фибробластов (bFGF), эпидермальный ФР EGF, β -2 микроглобулин (b2MG). Для унификации реакции использовали 2-х кратную коммерческую ПЦР-смесь (2x PCR Master Mix, Promega), которая обеспечивала высокую стабильность прохождения реакции в каждой серии.

Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 6% ПААГ геле. В качестве положительного контроля прохождения реакции в случаях где это возможно, использовали продукты ПЦР, полученные на матрице ДНК, выделенной из препарата ЭДТА-крови. Использование положительного ДНК-контроля возможно, если фрагмент гена, который подвергается транскрипции, находится полностью в одном экзоне. В случае, когда между двумя фрагментами гена находится интрон, размер амплифицируемого фрагмента ДНК будет значительно больше, чем фрагмент амплифицируемого участка кДНК. Для определения размера продуктов ПЦР использовали маркер молекулярных весов (50 б.р., DNA Step Ladder, Promega). После электрофореза гель фотографировали и анализировали оцифрованное изображение при помощи программы TotalLab v2.01. Оценку относительной концентрации выделенной РНК проводили, основываясь на результатах амплификации кДНК конститутивных экспрессируемых генов актина и β -2 микроглобулина. Концентрация выделенных нами препаратов РНК различалась в 1-18 раз.

Результаты исследования показывают, что профиль экспрессии выбранных нами генов неодинаков у всех пациентов и, возможно, зависит от их физиологического состояния или от наличия определенной патологии. При этом чувствительность метода ОТ-ПЦР позволяет выявить экспрессию гена независимо от количества выделенной РНК в условиях нашего эксперимента. Нами была выявлена активация экспрессии генов, которые в норме являются слабо-экспрессируемыми (за исключением P53 и TGF), количество копий мРНК которых не превышает 10 на клетку при конститутивной экспрессии[1]. Таким образом, отработанный метод позволяет адекватно оценивать экспрессию генов.