

УДК 61

Измерение суммарной экспрессии клеточного и рекомбинантного вариантов гена как способ посттрансфекционного анализа клеток

Заводский Роман Юрьевич – студент кафедры Гигиены и экологии Новосибирского государственного медицинского университета.

Аннотация: На стадии посттрансфекционного анализа клеток имеется несколько способов оценки степени успешности проведенной трансфекции. Одним из таких способов является ПЦР в реальном времени, позволяющая измерить относительные изменения в экспрессии какого-либо гена. Данный метод может применяться и для оценки экспрессии трансфецированного рекомбинантного гена, аналог которого присутствует в геноме и активно экспрессируется.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, анализ относительной экспрессии генов, трансфекция.

Полимеразная цепная реакция является одной из самых мощных технологий в молекулярной биологии. При помощи ПЦР специфические последовательности внутри кДНК могут быть амплифицированы миллионы раз при помощи последовательность-специфичных олигонуклеотидов, термостабильной ДНК-полимеразы и термоциклера. В традиционной ПЦР обнаружение и подсчет амплифицированной последовательности выполняются в конце реакции на последнем её цикле и включают в себя пост-ПЦР анализ, такой как электрофорез в геле и исследование полученного изображения. В ПЦР в реальном времени же ПЦР продукт и его количество измеряются каждый цикл [3].

Сегодня ПЦР в реальном времени стала одной из самых широко используемых техник подсчета экспрессии генов из-за своего широкого динамического диапазона, высокой чувствительности, отсутствие трудозатратной постреакционной обработки данных. Важным является как метод оценки экспрессии генов - абсолютное или относительное

измерение экспрессии, так и математическая методика обработки полученных данных, что учитывала бы вариации между биологическими и техническими повторами при выполнении реакции [2].

Главный аналитический показатель ПЦР в реальном времени - значение порогового цикла реакции C_t , который позволяет эффективно оценить относительную экспрессию исследуемых клеточных генов, может быть измерен и для анализа экспрессии рекомбинантных генов плазмиды, трансфекцию которой провели для исследуемых клеток. В данной случае выбор пал на CCR9 и его рекомбинантный аналог, закодированный в плазмиде; целью же для трансфекции стали дендритные клетки.

С целью доказательства валидности метода ПЦР в реальном времени для посттрансфекционного анализа клеток было произведено измерение C_t для генов P $gk1$, клеточного CCR9 и транскрибированного с плазмиды CCR9 в электропорированных дендритных клетках, P $gk1$ (Рис. 1), выступал в роли гена домашнего хозяйства гена, который в виду постоянства своей экспрессии может быть применен как нормализующий фактор для относительного уровня экспрессии целевого гена, из-за чего такие гены получили название референсных [1], а клеточный (Рис. 2) и экспрессируемый плазмидой (Рис. 3) CCR9 суммарно отражали тотальный уровень CCR9 в трансфицированных дендритных клетках. Полученные значения C_t были обработаны $\Delta\Delta C_t$ методом для оценки относительной нормализованной экспрессии.

В процессе исследования были использованы актуальные гайдлайны для проведения ПЦР в реальном времени [4].

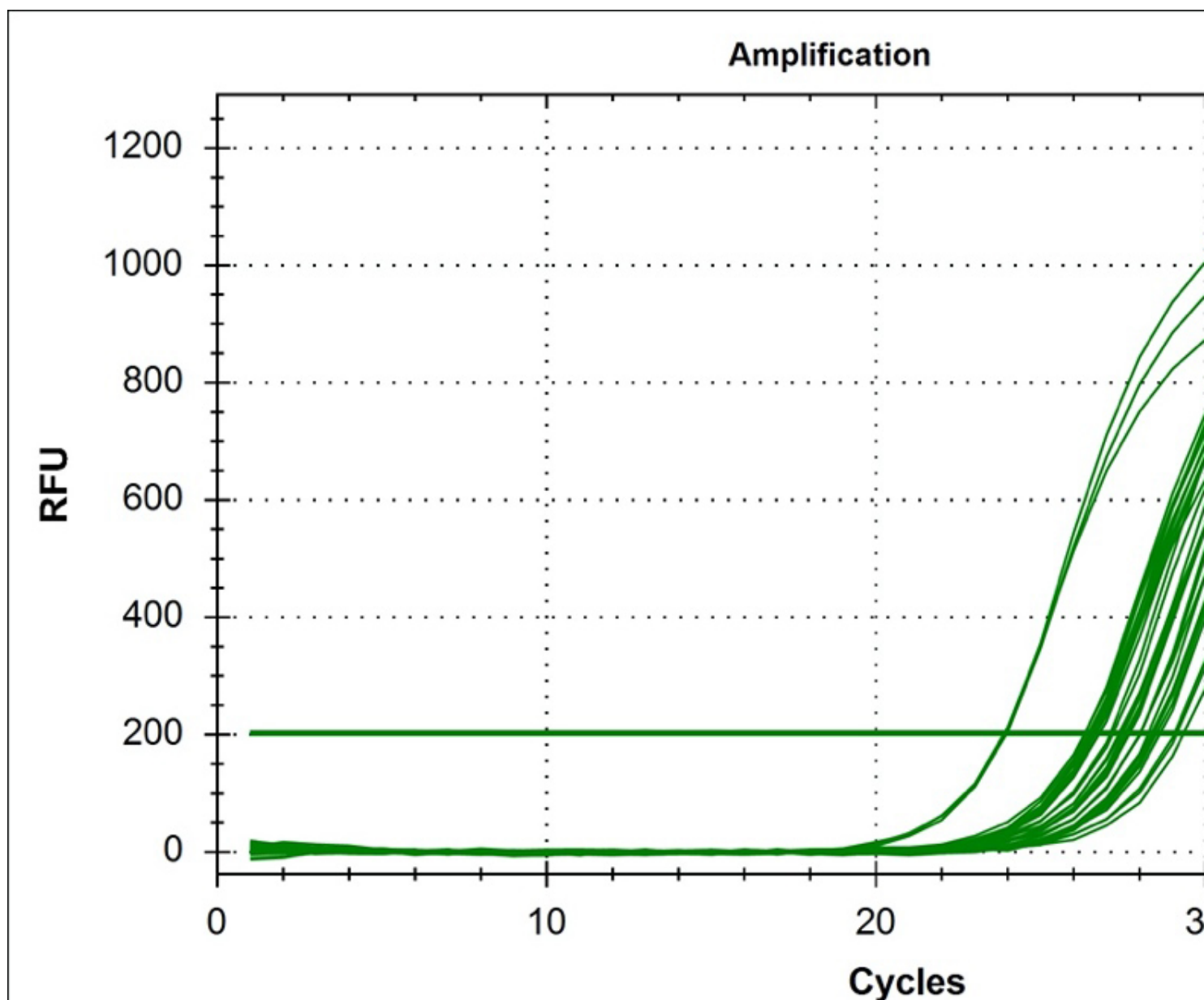


Рис. 1. Амплификация олигонуклеотидов (относительных единиц флуоресценции) к числу циклов

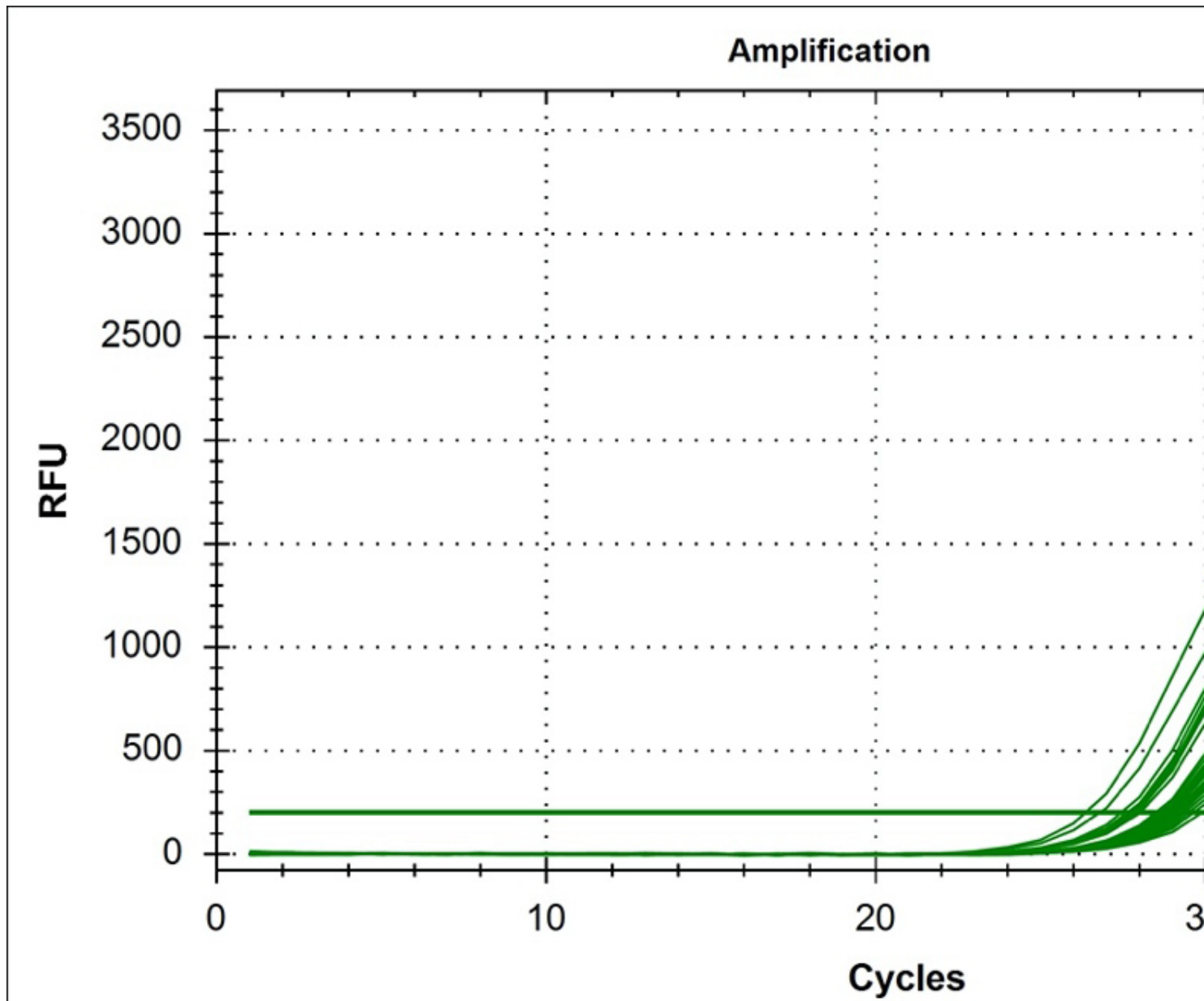
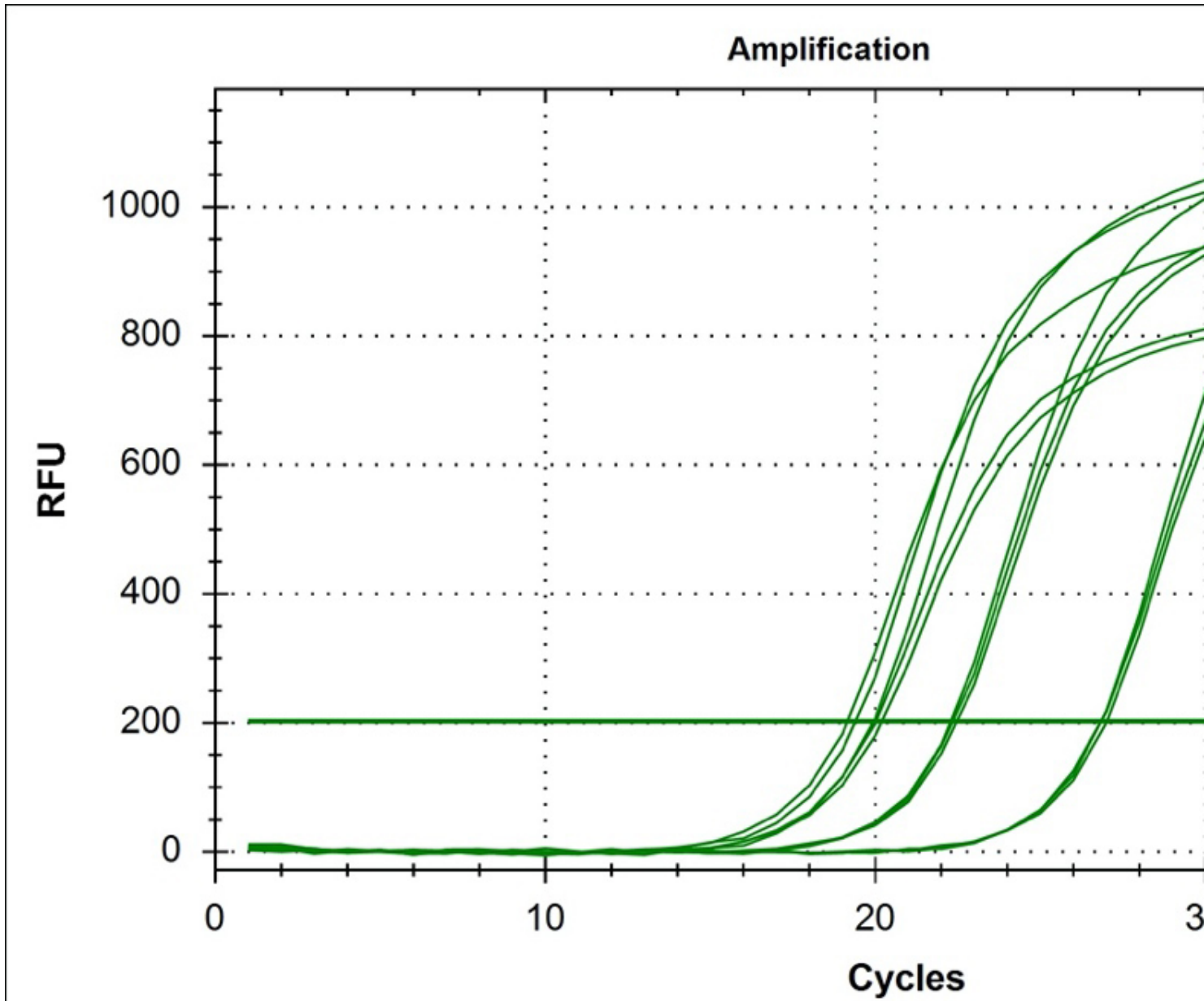


Рисунок 8. Отношение RFU и циклов амплификации для гена CCR9, транскрибированного с клеточной ДНК.



Вложение 2: Отношение RFU в момент выхода сигнала к началу экспоненциальной фазы к RFU в момент выхода сигнала к началу экспоненциальной фазы