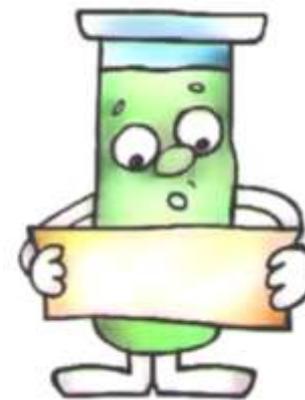


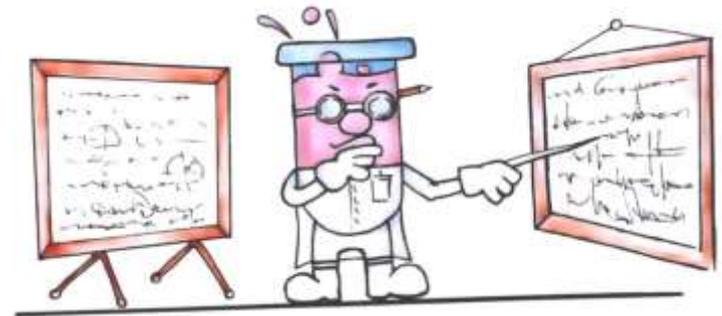
Анализ экспрессии генов: ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ И ИХ особенности

Как правильно спланировать эксперимент?



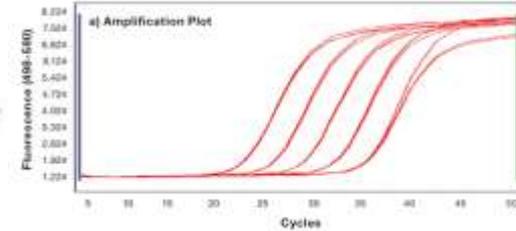


Экспрессия генов — это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок.



Регуляция экспрессии генов позволяет клеткам контролировать собственную структуру и функцию и является основой дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации.

Схема пробоподготовки для анализа экспрессии генов





Biolabmix

РНК - важный участник обратной транскрипции и от её качества и количества зависит эффективность процесса.



Качество РНК матрицы определяет объем информации или длину последовательности, которая может быть конвертирована в кДНК посредством обратной транскрипции.

Предотвращение загрязнения рибонуклеазами



Основная угроза для РНК - РНКазы А, являющаяся высокостабильным фактором загрязнения, который может присутствовать в окружающей среде любой лаборатории.

Основные рекомендации для предотвращения загрязнения РНКазы:

- При работе с РНК и другими реагентами используйте перчатки и чаще их меняйте, поскольку кожа является источником РНКаз.
- Обрабатывайте диэтилпирокарбонатом (DEPC) все пробирки и наконечники, если они не содержат маркировку “RNase free”, а также рабочие поверхности.
- Используйте свободные от РНКаз реагенты, в том числе высокоочищенную воду (вода, обработанная DEPC).
- Используйте ингибитор РНКаз для защиты РНК от активных РНКаз.
- Во время хранения реактивов, постановки и проведения обратной транскрипции все пробирки должны быть плотно закрыты.

Методы выделения НК



Жидкофазные методы

Жидкостная межфазная экстракция

*Фенол-хлороформная экстракция,
гуанидин-фенол-хлороформная экстракция*
Водная фаза – РНК (кислый pH)
Органическая фаза – ДНК (кислый pH)
Органическая фаза – белки и др. примеси

Неорганическая экстракция

СТАВ метод и др.
Супернатант – ДНК
Осадок – белки и др. примеси

Твердофазные методы

Колоночные методы

*Ионообменные сорбенты
на основе диоксида кремния*
(стеклянные частицы, диатомовая земля)
Гель-фильтрация
(сефароза)

Бесколоночные методы

Сорбент в виде индивидуальных частиц
(применение центрифугирования)
Сорбент в виде магнитных частиц
(применение магнитного поля)

1. S.C. Tan, B.C. Yip. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. J Biomed Biotechnol. 2009.

2. О.С. Антонова, Н.А. Корнева, Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии. Научное приборостроение, 2010.

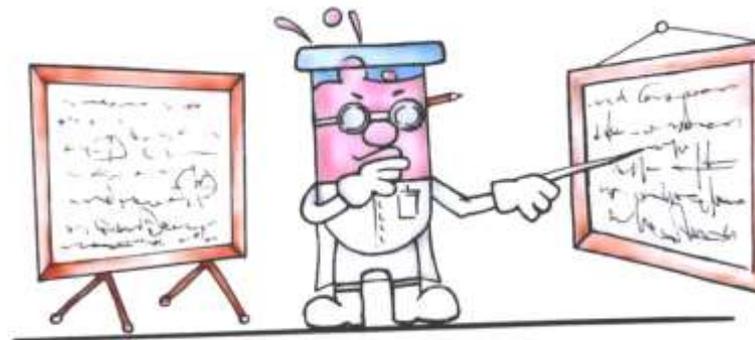
Преимущества и недостатки

Жидкофазный метод

- + Универсальный метод (Золотой стандарт)
- + Широкий спектр выделяемых НК
- + Исходное распределение по длинам РНК
- + Метод легко масштабируется
- Трудоёмкий при наличии большого количества образцов
- Сложно автоматизировать
- Токсичный (органическая экстракция; фенол гуанидин тиоцианат)

Твердофазный метод.

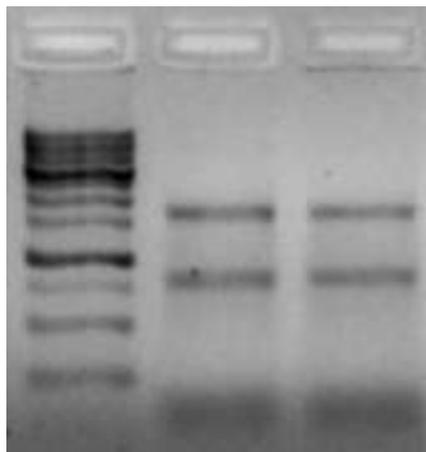
- + Быстрый и простой в исполнении
- + Возможности селективного выделения
- + Простая автоматизация
- Требуется тщательная гомогенизация иначе может засориться мембрана колонки (колоночный метод)
- Плохо масштабируется
- Потери среди очень коротких и очень длинных молекул



Выделение НК из эукариотических клеток, бактерий, растений

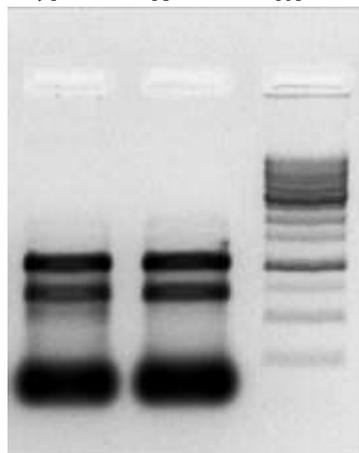
РНК, клетки человека

М Л К



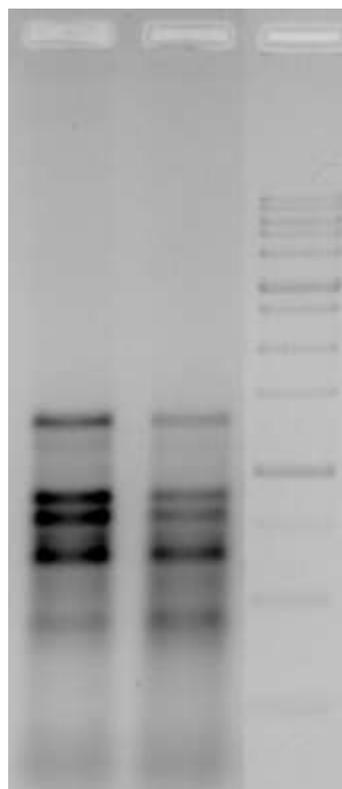
РНК, клетки *E. Coli*

Л К М

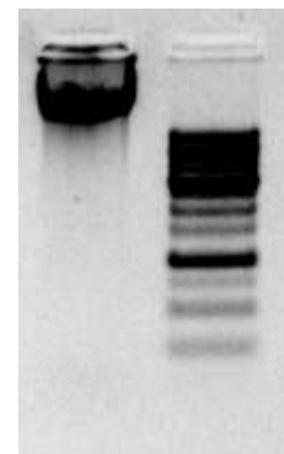


РНК, лист табака

Л К М



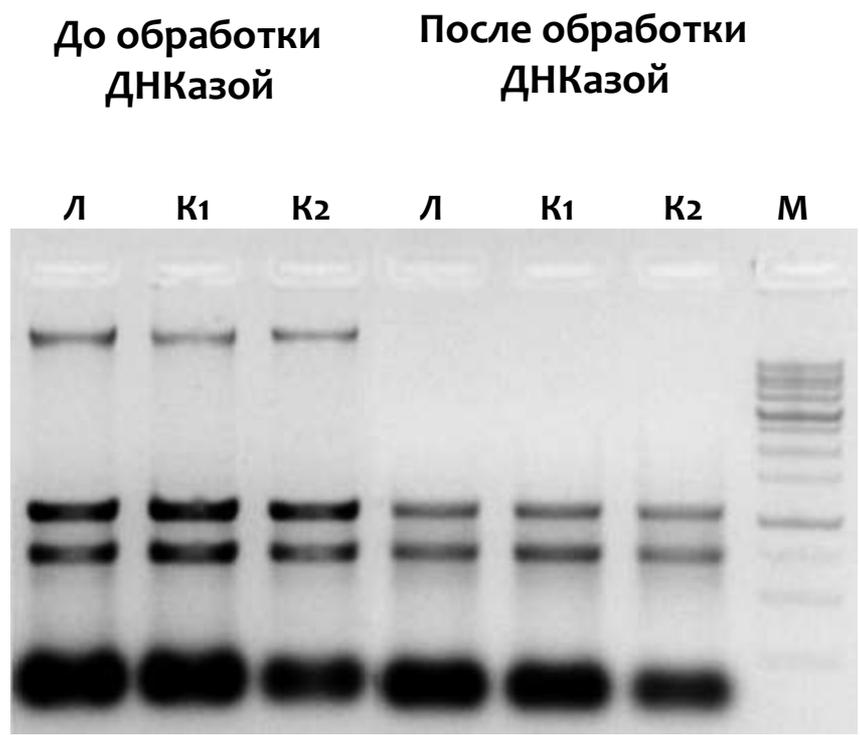
ДНК, клетки *E.Coli*



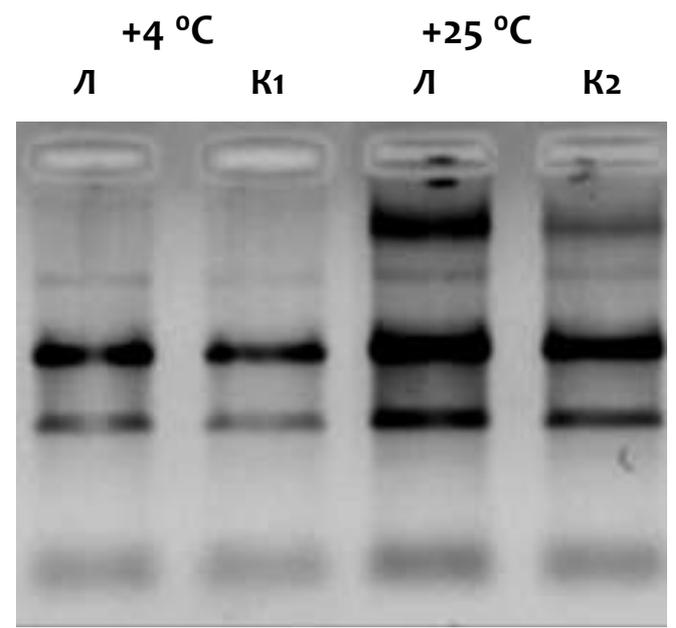
К – коммерческий реагент для выделения РНК

«Л» - Реагент для выделения РНК из клеток и тканей «ЛИРА» (LR) – на сайте biolabmix.ru

Влияние температуры при разделении водной и органической фаз



РНК выделена из клеток *E.Coli*.
Разделение фаз при +25 °С

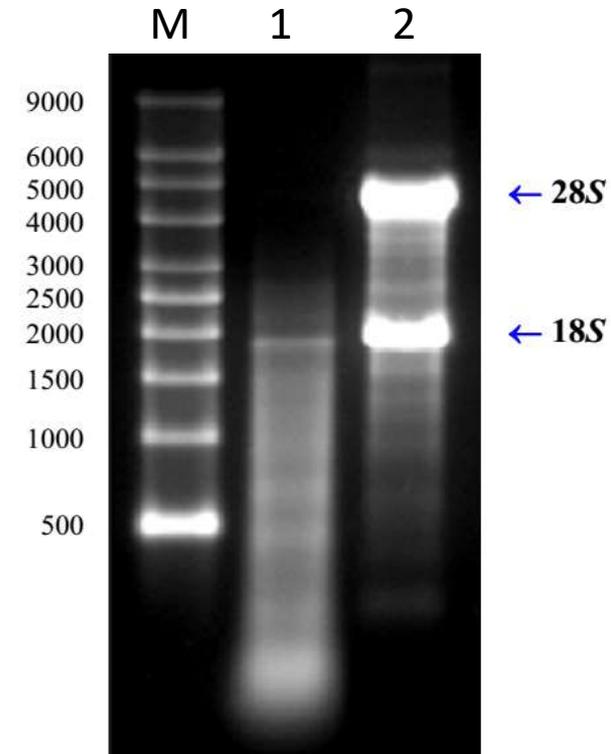


РНК выделена из линии клеток человека MCF-7

Проверить качество препарата РНК можно следующими методами:

- Выделенная фракция мРНК, в геле после электрофореза, должна выглядеть как шмер между 0.5 и 8 т.о. Большинство мРНК должно находиться между 1,5 – 4 т.о.;
- При разгоне суммарной РНК эукариот в агарозном геле должны быть видны как четкие полосы (бенды) 18S и 28S рРНК, в соотношении 1:2.
- Соотношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280}) чистого препарата РНК равно 1.9 – 2.0, при pH 7 – 8.

В случае присутствия примесей белков или других органических молекул (например, фенола) соотношение уменьшается. При более кислых pH, например, в воде величина A_{260}/A_{280} также уменьшается.



Выбор фермента для обратной транскрипции

Характеристика	Описание
Максимальная длина матрицы (процессивность)	Максимальная длина матрицы, которая может быть транскрибируема в полноразмерную кДНК. Некоторые ревертазы могут транскрибировать только короткие фрагменты (менее 3 т.п.н.), другие – более длинные (до 14 т.п.н.).
Оптимальная температура	Инкубация при высокой температуре может помочь устранить проблемы, вызванные вторичной структурой РНК матрицы, и снизить неспецифический отжиг сайт-специфических праймеров.
Чувствительность	Ревертазы различны в их способности копировать малое количество матрицы. Это особенно важно, когда выбранная мишень экспрессируется на низком уровне.
РНКаза Н-подобная активность	РНКаза Н удаляет РНК в комплексе РНК : кДНК. РНКаза Н-подобная активность может конкурировать с ДНК-полимеразной активностью фермента, в результате есть вероятность потери матрицы до синтеза полноразмерного кДНК транскрипта.

Ферменты, используемые в обратной транскрипции

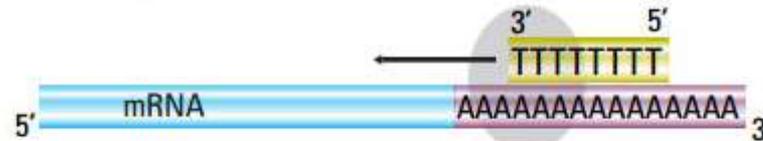
Фермент	Макс. длина матрицы (kb)	Опти-мум Т, °С	Чувстви-тельность	Транск-рипция сложных матриц	Актив-ность РНКазы Н
SuperScript II	14	42-65	+++	+++	нет
AMV ревертаза	12	42 (до 60)	++	+	есть
MMLV ревертаза	9	37	+	+	есть
C. therm-pol	3	60-70	++	+++	нет
Tth ДНК-pol	1	55-70	+	+	нет
MMLV –RN (Биолабмикс)	10	42-47	+++	++	нет

Праймеры для обратной транскрипции

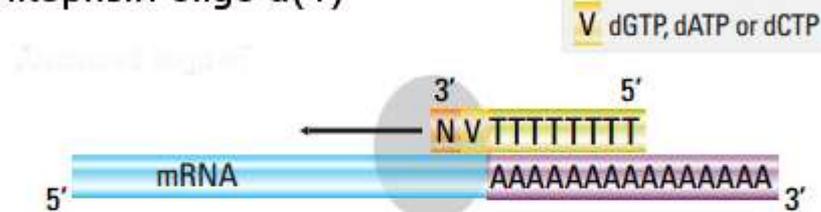


Biolabmix

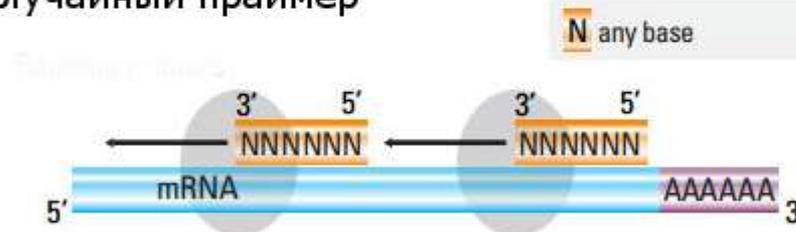
Обычный oligo d(T)



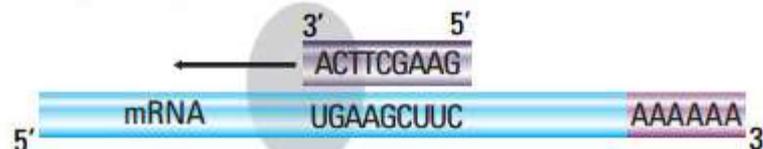
Якорный oligo d(T)



Случайный праймер



Ген-специфичный праймер



Неспецифические праймеры для обратной транскрипции

Тип праймера	Область связывания	Достоинства / комментарии
Олиго(dT) 12–18	3'-поли(А) конец эукариотических мРНК	Получение полноразмерных кДНК. Если есть матрицы с поли(А) участками, праймер может связаться с ними и привести к получению нецелевого продукта
Случайный гексапраймер	Множество сайтов по всей длине РНК	Обеспечивает равномерную представленность всей последовательности мРНК. Обеспечивает синтез кДНК с РНК, не содержащих поли(А) конца

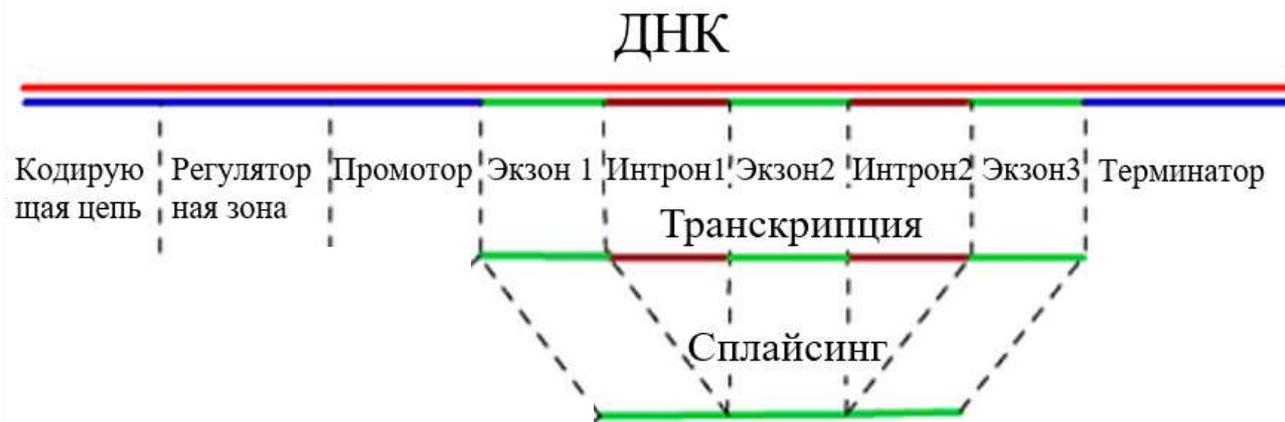
Рекомендации при подборе праймеров

- Длина праймера, в основном, составляет 18 – 30 нуклеотидов;
- Температура плавления 58-65 °С. Разница в температурах плавления (T_m) двух праймеров не должна превышать 3 °С;
- Рекомендуемая длина ампликона в ПЦР в режиме реального времени 70 – 150 п.н.;
- Оптимальный GC состав праймеров 40 - 60%. В идеале, G и C нуклеотиды должны быть распределены равномерно по всей длине праймера.
- Избегайте формирования на 3'-конце праймера подряд более трех G или C нуклеотидов для снижения риска неспецифического отжига.
- Если возможно, праймер должен заканчиваться на 3' конце G или C нуклеотидом.
- Праймеры не должны быть самокомплементарными и содержать участки комплементации между праймерами. А также праймеры не должны формировать шпильки.
- Избегайте формирования вторичных структур ампликона в местах посадки праймеров

Ген-специфические праймеры для обратной транскрипции



Biolabmix



Праймеры внутри одного экзона



с гДНК



с кДНК



Праймеры внутри разных экзонов



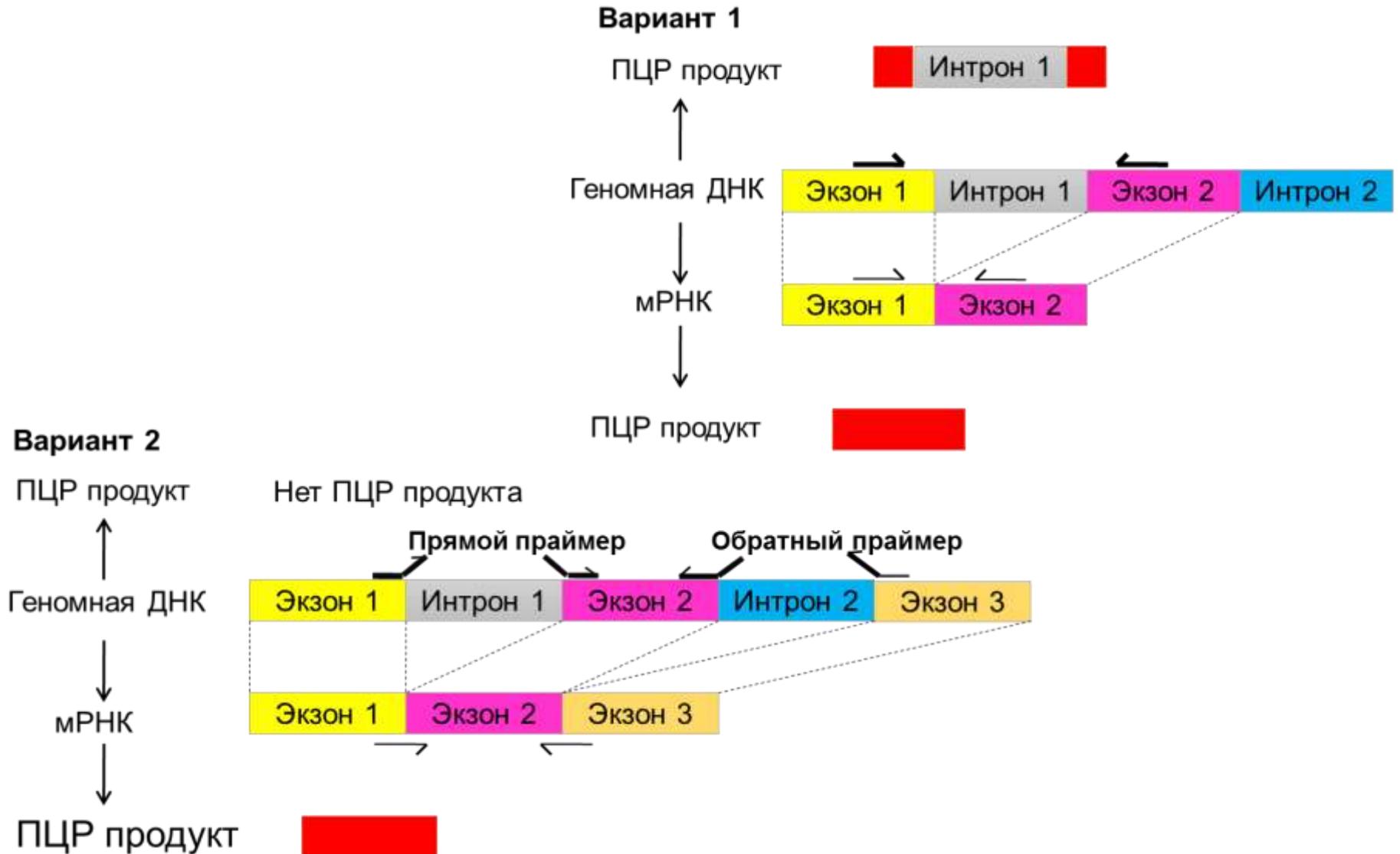
с гДНК



с кДНК

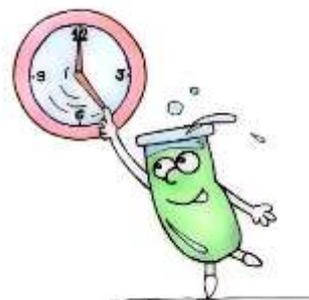
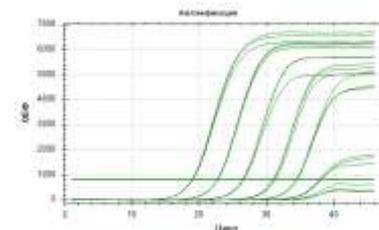


Схемы подбора ген-специфических праймеров

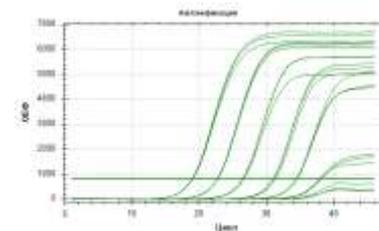


Схемы экспериментов по исследованию экспрессии генов методом ОТ-ПЦР

Одностадийная ОТ-ПЦР



Двухстадийная ОТ-ПЦР



Особенности одностадийного метода ОТ-ПЦР

Достоинства

1. **Более высокая чувствительность**, поскольку вся кДНК образца используется как матрица для ПЦР.
2. **Высокая точность.** Снижение шагов

Недостатки

1. Универсальные условия. Невозможность оптимизации одной из стадий отдельно.
2. Нет возможности хранить кДНК для возможных дальнейших анализов.

Область применения:

1. Идеально подходит для анализа большого количества образцов по нескольким мишеням
2. Удобный и эффективный инструмент для количественного анализа

3. **Защита от загрязнений.** Снижает шанс внесения контаминаций путем уменьшения шагов пипетирования и открывания пробирки.
4. **Специфичность.** Позволяет провести прямой анализ специфического транскрипта, так как в обеих реакциях используются сиквенс-специфические праймеры.

Особенности двухстадийного метода ОТ-ПЦР

Достоинства

- 1. Оптимизированные условия** реакций. Двухстадийный формат позволяет обе реакции проводить при оптимальных условиях, гарантирующих эффективность и точность анализа.
- 2. Идеально подходит для анализа большого количества мишеней с одного образца РНК**
- 3. При формировании коллекции образцов для длительного хранения с целью дальнейшей амплификации.** получения кДНК для последующего длительного хранения.
- 4. Возможность широкого выбора** праймеров.
- 5. Амплификация длинных последовательностей.** При правильной комбинации обратной транскриптазы и термостабильной ДНК-полимеразы в двухстадийной ОТ-ПЦР можно амплифицировать последовательность РНК протяженностью до 10 - 14 т.о.

Недостатки

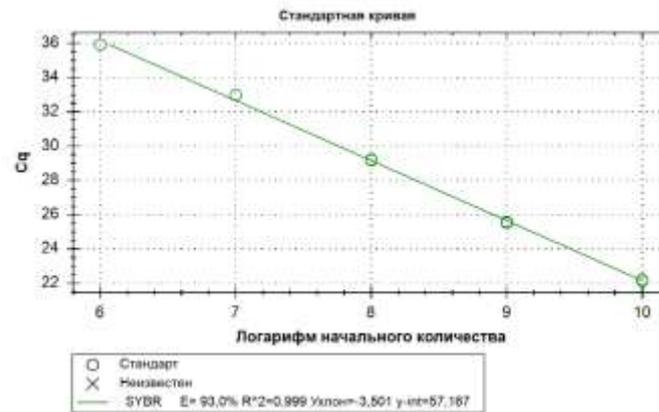
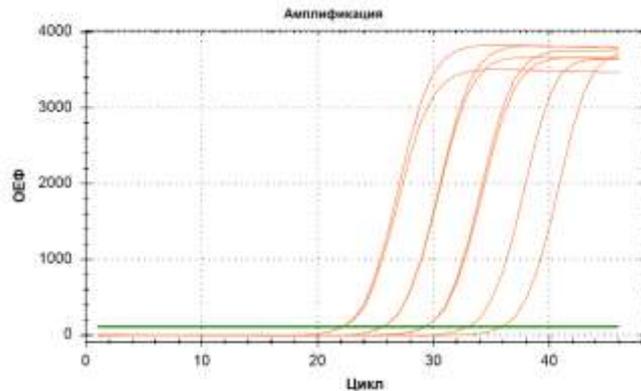
- 1. Большое количество времени** на проведение анализа.
- 2. Большое количество шагов**

Область применения:

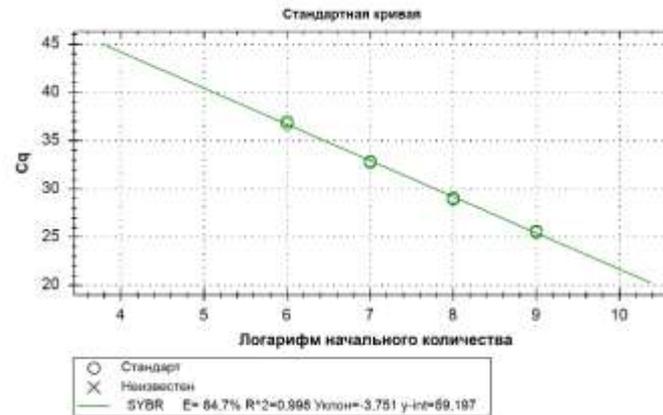
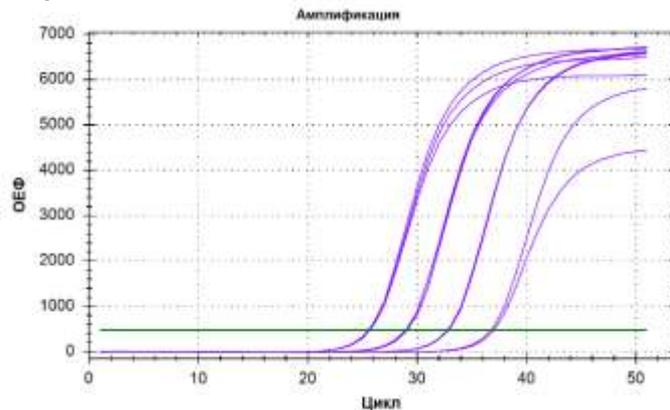
- 1. Идеально подходит для анализа большого количества мишеней с одного образца РНК**
- 2. При формировании коллекции образцов для длительного хранения с целью дальнейшей амплификации.**

Прямое сравнение одно- и двухстадийного метода ОТ-ПЦР

Одностадийный метод:



Двухстадийный метод:



Аmplification фрагмента мРНК гена CCSER2 в серии разведений суммарной РНК (10 пг – 100 нг), выделенной из клеток линии MCF-7. использовались реактивы ООО «БиоЛабМикс».

Относительный количественный анализ

Алгоритмы

$$NRQ = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{E_{ref}^{\Delta Ct, ref}}$$

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{\sqrt[n]{\prod_i E_{ref_i}^{\Delta Ct, ref_i}}}$$

« $\Delta\Delta Ct$ » метод

Livak et al (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $\Delta\Delta Ct$ Method

E-model. Учтена эффективность каждой пары праймеров (1 референс)

Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR

qBase Plus. Учтена эффективность всех пар праймеров. Использование нескольких референсных генов.

Общие принципы постановки экспериментов методом ОТ-ПЦР



- Амплификация одной мишени проводится в 3-4 параллельных реакциях (ячейках)
- Для корректной нормировки данных необходимо использовать 4-6 референсных генов
- Праймеры на все используемые мишени должны обладать близкими эффективностями
- Необходимый и обязательный набор контролей: ПЦР без ОТ; отрицательный контроль; внутренний контроль; положительный контроль



Biolabmix

Спасибо за внимание

