



УДК 54.052: 577.1

Исследование гуанидинизотиоционата для быстрого выделения РНК для изучения молекулярной биоэнергетики клетки с использованием полимеразной цепной реакции

Агафонова М.Н.

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань

Башмаков В.Ю., Попова А.А., Попов В.Н.

ГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Костромичева Е.В.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел

Кубланов И.В., Подосокорская О.А.

Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

Лебедева О.П., Рудых Н.А., Сиротина С.С.,

ФГАОУ ВПО «Белгородский национальный исследовательский университет», Белгород

Лямзаев К.Г.

НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва

Симонова М.А.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино

Тутукина М.Н.

Учреждение Российской Академии Наук Институт биофизики клетки РАН, Пуцино

Поступила в редакцию 21.11.2012 г.

Аннотация

При изучении условий выделения РНК показано, что гуанидинизотиоцианатный метод наиболее успешно применяется для экстракции РНК из клеток крови. Показано, что для оптимизации условий для идентификации специфичных фрагментов исследуемых генов методом ПЦР необходим подбор температуры отжига праймеров и концентрации $MgCl_2$.

Ключевые слова: гуанидинизотиоцианат, РНК, ПЦР в реальном времени

Studying the conditions of RNA extraction revealed the guanidine isothiocyanate protocol to be the most effective for RNA extraction from blood cells. The current study highlights the importance of microsurrounding maintenance while gene expression analysis is in progress. It was shown that primer melting temperature and $MgCl_2$ concentration adjustment is essential for PCR detection of certain sequences optimization.

Keywords: guanidine isothiocyanate, RNA, real-time PCR

Введение

Молекулярно-биологические методы исследования, часто называемые также молекулярно - генетическими методами, ДНК-анализом, ген - техноло-гическим анализом, генной диагностикой и т.п., являются принципиально но-вым видом

исследований и несомненно в течение ближайших десятилетий станут ведущими в клинической лабораторной диагностике [1].

Теоретическая часть

Практически все методы анализа нуклеиновых кислот, применявшиеся примерно до 1982 г., основывались на использовании изотопно меченных зондов [2]. Однако в последние 15 лет появилось множество нерадиоактивных меток - таких как биотин, дигоксигенин, флуорохромы и т.д. Эти метки не обеспечивают столь высокой чувствительности, как изотопные, но обладают тем преимуществом, что их можно широко использовать в клинических лабораториях, не подвергаясь риску радиоактивного облучения. По-видимому, к концу века нерадиоактивные методы анализа в диагностических лабораториях станут рутинными [3].

Методы гено- и фенотипирования интактных клеток и клеточных экс-трактов разрабатывались практически независимо, однако в настоящее время - в основном благодаря появлению метода ПЦР - у них появляется все больше точек соприкосновения. Теоретически ПЦР дает возможность амплифицировать уникальный ген в интактной клетке до такой степени, что его удастся визуализировать и идентифицировать в специфических клетках с помощью гибридизации с меченым зондом. Этот метод был описан Mullis в 1983 г., за что спустя 10 лет автор был удостоен Нобелевской премии. К несомненным достоинствам реакции относятся: высокая чувствительность и специфичность, возможность исследовать любой материал, включая гистологические препараты, сухую каплю крови, простота метода, экспресс-ответ (в тот же день) [1].

Молекулярно-биологические методы открыли новые перспективы перед онкологической диагностикой. Бесспорно, они являются наиболее важным направлением в развитии клинической лабораторной диагностики раковых заболеваний.

Применение метода ПЦР способствует развитию фундаментальных исследований в области изучения патогенеза хронических инфекционных заболеваний. Однако следует отметить, что метод ПЦР лишь дополняет спектр традиционных методов, используемых в микробиологической диагностике в настоящее время [4].

Эксперимент

Сначала мы готовили буфер D. Для этого смешивали 250 г гуанидин тиоционата, 293 мл воды, 17.6 мл 0.75 цитрата Na и 26.4 мл 10% сакрозила при 65 °С. Затем к 50 мл буфера D добавляли 0.36 мл 2-меркаптоэтанола относительно к 50 мл среды.

К 1 мл крови добавляли 10 мл раствора D. Туда добавляли : 1 мл 2М ацетата натрия (рН 4), 10 мл фенола, 2 мл хлороформ-изоамиловый спирт (49:1). Все это перемешивали в течение 10 сек. Затем 15 мин. держали на льду. Центрифугировали 20 мин. при 10000 g, 4 °С. В результате чего : - РНК оказалась в верхней фазе -ДНК и белок - в нижней фазе После этого верхнюю фазу осторожно перенесли в чистую пробирку и добавили 10 мл изопропанола. Инкубировали в течение 1 часа при -20 °С. После чего центрифугировали 20 мин. при 10000 g. РНК выпадала в осадок. К осадку добавляли 3 мл раствора D. Осаждали равным объемом изопропанола и

инкубировали 1 час при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем центрифугировали 10 мин. при максимальных оборотах на центрифуге Eppendorf. Растворяли осадок 70% этиловым спиртом. После чего осаждали и высушивали осадок. К полученному осадку добавляли 200 мл 0.5% SDS. Готовую РНК можно хранить при $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Со смывами производили те же манипуляции.

Обсуждение результатов

Таблица 1 позволяет сравнить два источника биологического материала для выделения РНК и выбрать наиболее оптимальный. Из результатов видно, что при выделении РНК из крови в одном случае из десяти наблюдается деградация РНК, что видно на электрофореze в виде светящегося шлейфа. Т.е. 90% всех образцов удовлетворяют нас своим качеством.

Таблица 1. Наличие деградации РНК при выделении

Метод	Образец исследования	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Гуанидинтиоцианатный	Кровь	-	+-	+	+	+	+	+	+
	Смыв	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-

Данные, полученные при использовании этой же методики для выделения РНК из смывов, свидетельствует о том, что 40% всех результатов носят негативный характер, а 60% - удовлетворяют наши требования.

Полученные образцы РНК использовались для получения комплиментарной ДНК в ревертазной реакции и ее использования в качестве матрицы при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). При проведении ПЦР мы варьировали концентрацию соли MgCl_2 в среде ПЦР. Нами было проведено 100 определений и подсчитано процентное соотношение положительных и отрицательных контролей в зависимости от концентрации MgCl_2 , а также определяли чистоту реакции по наличию шлейфа на электрофореze. Положительным контролем служили праймеры, разработанные для фактора элонгации альфа, используемые для нормировки при проведении РТ-ПЦР в реальном времени. Отрицательным – праймеры, разработанные для альтернативной оксидазы из картофеля, белка специфичного для растительных митохондрий.

Таблица 2. Влияние MgCl_2 на эффект проведения ПЦР

Концентрация MgCl_2 , мМ	(+) контр, %	(-) контр, %	Наличие шлейфа
0	80	0	-
2.5	100	0	-
5.0	100	5	-
7.5	100	10	+
10.0	100	15	+

Данные, приведенные в таблице, показывают, что наши требования, а это: 100% выход положительных контролей, 0% отрицательных контролей и отсутствие шлейфа на электрофореze, удовлетворяет концентрация MgCl_2 равная 2.5 мМ. Поэтому в наших исследованиях мы использовали именно это значение.

Кроме влияния $MgCl_2$ на протекание ПЦР было изучено влияние температуры отжига праймеров. Как известно, только при определенной температуре происходит их правильный отжиг и успешная гибридизация. Нами также было проведено 100 определений. Были получены следующие результаты:

Таблица 3. Влияние температуры отжига праймеров на эффект ПЦР

Т °С	(+) контр, %	(-) контр, %	Наличие шлейфа на ЭФ
52	100	10	++
54	100	5	+
56	100	3	-
58	100	0	-
60	90	0	-
62	80	0	-

Температура отжига праймеров прежде всего зависит от процента G и C среди азотных оснований. Чем больше это значение, тем больше и температура отжига. G и C - это количество гуанидина и цитозина в молекуле праймера. Т.е. одним из специфичных свойств праймеров является температура его отжига, что и влияет на успех реакции. В нашей работе скрининг температур показал, что для определения ЧП оптимальной является $t=58$ С. В этих условиях мы наблюдали 100% положительный контроль, 0% - отрицательного контроля и отсутствие шлейфа на ЭФ.

Заключение

Во всех живых организмах протекают сходные биохимические процессы, катализируемые ферментами, которые ускоряют идентичные химические реакции. Например, как у растений, так и у животных функционирует цикл трикарбоновых кислот, реакции которого катализируют ферменты. Структура этих ферментов может различаться у разных организмов, однако выполняемые ими функции сходны. Такие ферменты, играющие одинаковую роль в метаболизме разных организмов, называют гомологичными. Аналогичное название имеют гены, кодирующие эти ферменты.

Несмотря на то, что структура гомологичных белков может варьировать, они имеют высококонсервативные участки, входящие в состав каталитических центров [5]. По аналогии с белками существуют консервативные последовательности и в генах. Если создать праймеры, комплементарные таким консервативным последовательностям, то с помощью ПЦР можно найти гомологичный ген в организме, в котором наличие этого гена неизвестно. Нами ранее активно использовалась полимеразная цепная реакция в реальном времени для оценки концентрации мРНК для генов, кодирующих компоненты электронтранспортной цепи и антиоксидантных систем, что принципиально для изучения биоэнергетических параметров митохондрий из различных источников [6-9].

Таким образом, нами накоплен опыт исследования ключевых биохимических и молекулярно-генетических процессов клетки, а имеющееся научное оборудование позволяет реализовывать широкий спектр исследований различных метаболических путей и генетических механизмов адаптации к различным физиологическим состояниям.

Список литературы

1. Молекулярная клиническая диагностика. Методы (Под. ред. С. Херрингтона, Дж. Макги). М.: Мир. 1999. 558 с.
2. Инге-Вечтомов С.Г. Введение в молекулярную генетику. М.: Высшая школа. 1994. 337 с.
3. Анализ генома. Методы (Под. ред. К. Дейвиса). М.: Мир. 1990. 246 с.
4. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California. 1990. 260 p.
5. Popov V.N. Possible role of free oxidation processes in regulation of reactive oxygen species production in plant mitochondria (review) // Biochem. Soc. Transactions. 2003. V. 31. P 939-941.
6. Амерханов З.Г. Роль UCP2 и АДФ/АТФ-антипортера в разобщающем действии супероксид-радикала на препараты митохондрий почек // Доклады Академии наук. 2008. Т. 423, № 2. С. 264-267.
7. Епринцев А.Т., Маслова Е.В., Федорин Д.Н., Попов В.Н. Физико-химические и кинетические характеристики изоформ изоцитратлиазы из кукурузы // Биохимия. 2009. Т. 78, N 5, С. 651-656.
8. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ахмад Д.А., Попов В.Н. Роль дифференциальной экспрессии генов *sdh1-1* и *sdh1-2* в изменении изоферментного состава сукцинатдегидрогеназы в прорастающих семенах кукурузы // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2010. № 3. С. 324-332.
9. Popov V.N., Eprintcev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U. Succinate Dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is Regulated by Light via Phytochrome A // FEBS Letters. 2010. V.584, N 1. P. 199-202.

Агафонова Мария Николаевна – ассистент, Химический институт им. А.М.Бутлерова ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, 8 (843) 233-74-16

Костромичева Екатерина Вячеславовна – ассистент кафедры биотехнологии факультета биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел

Кубланов Илья Валерьевич – м.н.с., Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

Лебедева Ольга Петровна – доцент кафедры акушерства и гинекологии медицинского факультета ФГАОУ ВПО «Белгородский национальный исследовательский университет», Белгород

Лямзаев Константин Геннадьевич – научный сотрудник, НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва

Подосокорская Ольга Андреевна – м.н.с., Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Пущино

Agafonova Maria N. – assistant at Institute Of Chemistry named after A.M. Butlerov, Kazan Federal University, Kazan, dekanat7@mail.ru

Kostromicheva Ekaterina V. – assistant at Dep. Of Biotechnology, Faculty Of Biotechnology and Veterinary, Orel State Agricultural University, Orel

Kublanov Ilya V. – jr. researcher at RAS Institute Of Microbiology named after S.N. Vinogradsky, Moscow

Lebedeva Olga P. – docent at Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty Of Medicine, National Research University Belgorod State University, Belgorod

Lyamzaev Konstantin G. – researcher at The A.N. Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology, Moscow

Podosokorskaya Olga A. – jr. researcher at RAS Institute Of Microbiology named after S.N. Vinogradsky, Puschino,

Попова Анна Александровна – аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Рудых Наталья Александровна - доцент кафедры акушерства и гинекологии медицинского факультета ФГАОУ ВПО «Белгородский национальный исследовательский университет», Белгород

Симонова Мария Александровна – аспирант ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Сиротина Светлана Сергеевна – аспирант биолого-химического факультета ФГАОУ ВПО «Белгородский национальный исследовательский университет», Белгород

Тутукина Мария Николаевна – научный сотрудник Учреждение Российской Академии Наук Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Попов Василий Николаевич – профессор, д.б.н., заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Башмаков Виктор Юрьевич – аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Popova Anna A. – PhD student at Genetics, Cytology and Bioengineering Dep., Faculty of Biology and Soil Sciences, Voronezh State University, Voronezh

Rudykh Natalya A. - docent at Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty Of Medicine, National Research University Belgorod State University, Belgorod

Simonova Maria A. – PhD student at Institute Of Theoretical And Experimental Biophysics of RAS, Puschino

Sirotnina Svetlana S. – PhD student at Biochemical faculty of National Research University Belgorod State University, Belgorod

Tutukina Maria N. – researcher at Institute Of Cell Biophysics of RAS, Puschino

Popov Vasily N. – professor, Dr. Biol., Head of Genetics, Cytology and Bioengineering Dep., Faculty of Biology and Soil Sciences, Voronezh State University, Voronezh

Bashmakov Victor Yu. – PhD student at Genetics, Cytology and Bioengineering Dep., Faculty of Biology and Soil Sciences, Voronezh State University, Voronezh