

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

В.А. Ходжаев

«16» 07 2010

Регистрационный № 063-0610

**МЕТОДИКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА
ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИКЛИНОВ СЕМЕЙСТВ
А, В, С, D и E.**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет».

АВТОРЫ:

к.м.н. Воропаев Е.В.

к.б.н. Баранов О.Ю.

Воропаева А.В.

д.м.н., доцент Беляковский В.Н.

Ачинович С.Л.

д.б.н. Падутов В.Е.

Гомель, 2010

Целью данной инструкции является описание технологического процесса оценки уровня экспрессии генов циклинов семейств А, В, С, D и Е, детерминирующих механизмы регуляции клеточного цикла и связанных с развитием онкологических процессов. Методологические принципы анализа уровня экспрессии основаны на количественной оценке содержания транскриптов (мРНК) данных генов в анализируемой ткани методом ПЦР в реальном времени. Данная технология может быть использована для молекулярно-генетической оценки физиологического статуса пациентов и анализа возможного риска возникновения онкологических заболеваний у пациентов в ходе диагностических исследований, проводимых в специализированных лабораториях областных медицинских учреждений.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Лабораторное оборудование, применяемое для количественной оценки содержания мРНК различных генов должно позволять проводить все необходимые этапы работы с рибонуклеиновыми кислотами, начиная с их выделения из биологического материала, перевода в стабильную форму в виде кДНК, дальнейшую амплификацию с оценкой кинетических характеристик ПЦР и дополнительную верификацию продуктов амплификации методом электрофореза.

В табл. 1 приведен оптимальный вариант набора оборудования для организации работ, связанных с анализом экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени.

Таблица 1

Оптимальный набор оборудования

Наименование оборудования и основные характеристики	Кол-во
<i>Пробоподготовка</i>	
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур от 0 до +25 °С	1
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10 до +99 °С	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 5–50 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл)	1
Насос с колбой-ловушкой	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 °С	1
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 °С	

Спектрофотометр возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот	1
УФ-стерилизатор, или его аналог	1
<i>Проведение ПЦР в реальном времени</i>	
Амплификатор (термоциклер) с оптической системой, предназначенный для проведения ПЦР и детекции в режиме «реального времени»	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 5–50 мкл (2 шт.); 20–200 мкл; 100–1000 мкл)	1
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10 до +99 °С	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 °С	1
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 °С	
<i>Анализ результатов амплификации методом электрофореза</i>	
Система для проведения гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 5–50 мкл, 20–200 мкл; 100–1000 мкл)	1
УФ-трансиллюминатор	1
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером и принтером	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 °С	1
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 °С	

Набор расходных материалов и лабораторных аксессуаров: резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера), матированные стеклянные пестики, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

Перечень набора основных реагентов для работы напрямую связан с выбором оригинальных методик анализа и приготовления собственных реакционных смесей или использования коммерческих наборов.

В табл. 2 приведен список реагентов и имеющихся в продаже готовых коммерческих наборов для проведения различных этапов анализа количественного содержания транскриптов методом ПЦР в реальном времени. Следует отметить, что качество используемых реагентов, включая воду и солевые растворы, должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-генетических исследований.

Список реагентов и коммерческих наборов, необходимых для проведения количественно анализа транскриптов

Наименование реагентов
<i>Пробоподготовка</i>
Цитрат натрия ЭДТА Этанол
<i>Выделение РНК</i>
Гуанидинтиоцианат Цитрат натрия Лаурилсаркозин натрия Этанол Ацетат натрия Фенол Хлороформ
<i>Обратная транскрипция и синтез кДНК</i>
Обратная транскриптаза с буфером Праймер Oligo(dT) дНТФ
<i>Проведение ПЦР</i>
Трис Соляная кислота Хлорид магния Хлорид калия дНТФ Олигонуклеотиды (праймеры) Термостабильная ДНК-полимераза с 5'-3'-экзонуклеазной активностью Меченные олигонуклеотиды (зонды) SYBRGreen или аналог
<i>Электрофорез и окраска</i>
Агароза Трис Борная кислота ЭДТА Этидиумбромид

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Анализ состояний с подозрением на развитие онкологических процессов;

2. Дополнительные лабораторные критерии диагностики онкологических состояний.

Технология, предложенная в разработанной нами инструкции, является

наиболее оптимальным лабораторным методом, позволяющим выявлять патологические изменения в экспрессии генов-циклинов, что является необходимым для разработки дополнительных диагностических критериев, прогноз возникновения и развития онкологической патологии и может применяться в специализированных лабораториях медицинских и научных учреждений.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Общие противопоказания к инвазивным исследованиям.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Материал для исследования

Материалом для выделения РНК с целью определения уровня экспрессии генов-циклинов являются биоптаты из участков (шейки матки, кишечника, желудка, щитовидной железы, молочной железы) с подозрением развития онкологических процессов в сочетании с образцами рядом расположенных сегментов без внешних признаков патологии.

Хранение биологического материала перед выделением РНК осуществляется: кратковременно — при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (до 1 недели), долговременно (1 неделя – 1 год) — в жидком азоте или при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ с применением специальных коммерческих растворов (табл. 2) или консервирующей среды следующего состава: 10 мМ цитрата натрия, 10 мМ ЭДТА pH 6,6. В случае использования консервирующего состава, биоптаты перед заморозкой следует выдержать в растворе при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3–5 ч.

Выделение мРНК

Для получения препаратов РНК предпочтительно использовать готовые коммерческие наборы. Некоторые из них приведены в табл. 2. В альтернативном случае предлагается выделение РНК по нижеприведенной методике:

Образец крови, соскоба слизистой оболочки (100 мкл) или ткань биоптата (20 мг) помещают в пробирку типа «Eppendorf» на 1,5 мл, добавляют 500 мкл экстрагирующего буфера соответствующего состава (4 М раствор гуанидинтиоционата, 25 мМ раствор цитрата натрия, 0,5% раствор лаурилсаркозина натрия, 0,1 М метанола) и гомогенизируют до однородного состояния. Далее пробирку закрывают и перемешивают содержимое на вихревом смесителе ($400\text{--}600\text{ мин}^{-1}$) в течение 5 с. На следующем этапе к содержимому добавляют 50 мкл 3 М раствора ацетата натрия (pH 5,0) и перемешивают на вихревом смесителе ($400\text{--}600\text{ мин}^{-1}$) в течение 5 с. После перемешивания к гомогенату добавляют 150 мкл фенола, вновь перемешивают и центрифугируют при $15000\times g$ ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. По окончании центрифугирования пипеткой отбирают 600 мкл супернатанта, переносят в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и смешивают с 850 мкл хлороформа, центрифугируют при $15000\times g$ ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. По окончании центрифугирования пипеткой

отбирают 500 мкл супернатанта, переносят в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и добавляют 500 мкл изопропанола. Содержимое пробирки перемешивают и инкубируют при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин. Далее производят центрифугирование при $15000\times g$ ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 25 мин. Затем супернатант сливают, а полученный осадок РНК промывают 1000 мкл 65% этанола, охлажденного до температуры $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. После промывания содержимое пробирки центрифугируют при $15000\times g$ ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. Процедуру промывки повторяют 3 раза для удаления из осадка остатков изопропанола. После промывки этанолом пробирки размещают в стерильном боксе и, открыв крышки, просушивают осадок РНК при температуре $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15–20 мин до полного испарения этанола. Высушенный осадок растворяют в 30 мкл бидистиллированной и деионизированной воды. Далее к раствору добавляют 60 мкл экстрагирующего буфера (20 мМ раствор Трис-НСI (рН 7,6), 0,5 М раствор хлорида натрия, 1 мМ раствор ЭДТА, 0,1% раствор лаурилсульфата натрия). Затем к раствору добавляют 1 мл 35% суспензии олиго dT-целлюлозы и перемешивают. Далее полученный раствор помещают в колонку и дважды промывают 5 мл экстрагирующего буфера. Затем колонку прогревают при температуре $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин. Далее мРНК элюируют с колонки в пробирку с помощью 750 мкл буфера (10 мМ раствор Трис-НСI, рН 7,6; 1 мМ раствор ЭДТА; 0,05% раствор лаурилсульфата натрия) при температуре $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. К полученному элюату добавляют 750 мкл изопропанола. Содержимое пробирки перемешивают и инкубируют при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин. Далее производят центрифугирование при $15000\times g$ ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 25 мин. Затем супернатант сливают, а полученный осадок мРНК промывают 1000 мкл 65% этанола, охлажденного до температуры $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. После промывания содержимое пробирки центрифугируют при $15000\times g$ ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. Процедуру промывки повторяют 3 раза для удаления из осадка остатков изопропанола. После промывки этанолом пробирки размещают в стерильном боксе и, открыв крышки, просушивают осадок мРНК в течение 10–15 мин ($T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$) до полного испарения этанола. Высушенный осадок растворяют в 30 мкл элюирующего буфера (1 мМ цитрат натрия, 2 мМ ЭДТА рН 6,6) и хранят при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Количество полученной мРНК в препарате оценивают с помощью спектрофотометра.

Проведение обратной транскрипции

В ходе обратной транскрипции мРНК переводится в более стабильную форму в виде кДНК, что позволяет в дальнейшем хранить образцы или проводить работы без существенной деградации нуклеиновых кислот в ходе длительного времени.

Для выполнения обратной транскрипции также предпочтительно использовать готовые коммерческие наборы. Некоторые из них приведены в табл. 2. В альтернативном случае предлагается провести синтез кДНК по нижеприведенной методике.

В пробирку объемом на 0,2–0,5 мл добавляют поочередно: образец выделенной РНК (0,5–2 мкг) до 10 мкл, Oligo (dT) праймер (40 мкМ) — 2 мкл, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ, 2 мМ каждого). Конечный объем смеси доводят водой до 16 мкл. Далее смесь инкубируют при температуре 75 °С в течение 5 мин и затем охлаждают в ледяной бане или твердотельном термостате (Т = 0 °С). Затем в пробирку поочередно добавляют: 10-кратный буфер для обратной транскрипции (500 мМ Трис-НСl, рН 8,3, 750 мМ хлорид калия, 30 мМ хлорид магния, 100 мМ дитиотрейтол) — 2 мкл, РНКазин (10 ед./мкл) — 1 мкл, обратную транскриптазу (200 ед./мкл) — 1 мкл. Далее смесь инкубируют при 42 °С в течение 1 ч. Затем останавливают реакцию нагреванием до 90 °С в течение 10 мин. Продукты обратной транскрипции хранят при -20 °С до последующего анализа.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) (Real-Time PCR) является современной модификацией классического ПЦР. Принципы ПЦР в реальном времени основываются на детекции и количественной оценке в конце каждого цикла амплификации концентрации флюоресцирующих комплексов или агентов, отражающих количество ампликонов — репортерную флуоресценцию.

В данной инструкции использованы два протокола ПЦР-РВ, различающиеся по способам генерации репортерной флуоресценции: SYBR Green — применение интеркалирующих флуоресцентных агентов, флуоресценция которых значительно возрастает при связывании с двуцепочечной ДНК; TaqMan — использование меченных флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб, комплементарных участку PCR-продукта.

В ходе SYBR Green протокола используется два праймера и интеркалирующий краситель, TaqMan — два праймера и зонд (меченный по обоим концам олигонуклеотид).

Для получения стандартизированных результатов ПЦР предпочтительно использовать готовые коммерческие наборы. Протоколы проведения ПЦР-РВ с использованием отдельных реагентов приведены ниже:

SYBR Green

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 10×ПЦР-буфер (100 мМ раствор Трис-НСl, рН 9,0, 500 мМ раствор хлорида калия, 25 мМ раствор хлорида магния) — 2,5 мкл, смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ, 10 мМ раствор каждого) — 0,5 мкл, праймер F (10 мМ раствор) — 1 мкл, праймер R (10 мМ раствор) — 1 мкл, Taq ДНК-полимераза (5 ед./мкл) — 0,2 мкл, 100×SYBRGreen (в ДМСО) — 0,25 мкл, образец кДНК — 1 мкл. Конечный объем доводится водой до 25 мкл.

Обычно для проведения ПЦР-РВ более 1 образца готовится общий раствор (Master mix), в который входят все компоненты смеси в количестве, соответствующем числу образцов, кроме образца кДНК. Образец вносится

индивидуально в каждую пробирку, содержащую аликвотированный (на 1 анализ) Master mix.

Программа амплификации:

1 этап (1 цикл): Денатурация. $t = 3$ мин, $T = 94$ °С.

2 этап (35 циклов): Денатурация. $t = 15$ с, $T = 94$ °С. Отжиг. $t = 15$ с, $T = 60$ °С. Элонгация. $t = 20$ с, $T = 72$ °С. Регистрация сигнала.

3 этап (88 циклов): Плавление $T = 72-94$ °С, $\Delta T = 0,25$ °С/цикл, $t = 5$ с. Регистрация сигнала.

4 этап (1 цикл): Охлаждение реакционной смеси. $t = 5$ мин, $T = 4$ °С.

TaqMan

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: 10×ПЦР-буфер (100 мМ раствор Трис-НСl, рН 9,0, 500 мМ раствор хлорида калия, 25 мМ раствор хлорида магния) — 2,5 мкл, смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ, 10 мМ раствор каждого) — 0,5 мкл, праймер F (5 мМ раствор) — 1 мкл, праймер R (5 мМ раствор) — 1 мкл, меченная проба (10 мМ р-р) — 1 мкл, Таq ДНК-полимераза (5 ед/мкл) — 0,2 мкл, образец кДНК — 1 мкл. Конечный объем доводится водой до 25 мкл.

Программа амплификации:

1 этап (1 цикл): Денатурация. $t = 3$ мин, $T = 94$ °С.

2 этап (40 циклов): Денатурация. $t = 15$ с, $T = 94$ °С. Отжиг и элонгация. $t = 60$ с, $T = 60$ °С. Регистрация сигнала.

3 этап (1 цикл): Охлаждение реакционной смеси. $t = 5$ мин, $T = 4$ °С.

Структура праймеров и зондов, используемых для оценки уровня экспрессии генов циклинов семейств А, В, С, D и Е, приведены в табл. 3. Кроме предложенных вариантов олигонуклеотидов можно использовать готовые коммерческие наборы праймеров (табл. 2) или дублировать методику из источников литературы.

Таблица 3

Структура праймеров и зондов, используемых для оценки уровня экспрессии генов циклинов семейств А, В, С, D и Е

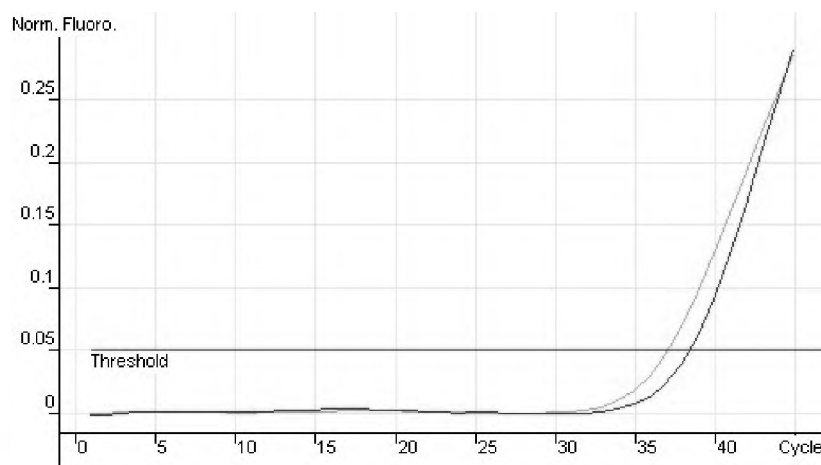
Название локуса	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность
A1	CyclinA1F	TGGATCAGAAAATGCCTTCC
	CyclinA1R	CTTGAGTGTGCCGGTGTCTA
A2	CyclinA2F	ATTTTCCCCCAACTGGATTCC
	CyclinA2R	CTCCCAAAGTGCTGGGATTA
B1	CyclinB1F	CTGAAAATAAGGCGAAGATCAACA
	CyclinB1R	GCATTTTGGCCTGCAGTTGT
B2	CyclinB2F	TCTTACAACCTCCTTGCCAACTAAG
	CyclinB2R	AGTGAACGTTAGCATGGAAGACTT

Название локуса	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность
B3	CyclinB3F	GCAGCTGAATCTCTAAGTGATGCT
	CyclinB3R	GATGACTGGGCACAATTTTGC
C	CyclinCF	CCTTATAGACCTTTGCTCCAGTATGTG
	CyclinCR	GAAAGCTCAGCAAACCATTGC
D1	CyclinD1F	TGGTGAACAAGCTCAAGTGG
	CyclinD1R	CTGGCATTTTGGAGAGGAAG
D2	CyclinD2F	ATCACCAACACAGACGTGGA
	CyclinD2R	ACGGTACTGCTGCAGGCTAT
D3	CyclinD3F	TGATTTCCCTGGCCTTCATTC
	CyclinD3R	ACAGAGGGCCAAAAAGGTCT
E1	CyclinE1F	CGTGCGTTTGCTTTTACAGA
	CyclinE1R	TTTGATGCCATCCACAGAAA
E2	CyclinE2F	TCAGAAAAGGGGGACAGTTG
	CyclinE2R	CCTGGTGGTTTTTCAGTGCT
<i>Зонды (в случае TaqMan)</i>		
A1	CyclinA1probe	FAM - TGGATGAACTAGAGCAGGGG-TAMRA
A2	CyclinA2probe	FAM - AAGAAGTAAAGGCTGGGTGC-TAMRA
B1	CyclinB1probe	Fam-CAGGCGCAAAGCGCGTTCCT-Tamra
B2	CyclinB2probe	Fam-AAAGTGTACGGCGTGTTT-MGB-Tamra
B3	CyclinB3probe	Fam-CTGCCACTACCACCCAGAGCTCCA-Tamra
C	CyclinCprobe	Fam-AGACATGTTGCTTCCCCTTGCATGGA-Tamra
D1	CyclinD1probe	Fam-CCGCACGATTTTCATTGAAC-Tamra
D2	CyclinD2probe	Fam-GTCTCAAAGCTTGCCAGGAG-Tamra
D3	CyclinD3probe	Fam-GACAGGCCTTGGTCAAAAAG-Tamra
E1	CyclinE1probe	Fam-TGGAAGAGTGTTTCTTCCACAA-Tamra
E2	CyclinE2probe	Fam-GGAGGCATTATGACACCACC-Tamra

Предварительная оценка качественных показателей реакции и достоверности результатов ПЦР-РВ

Кроме имеющихся образцов для качественного контроля ПЦР-РВ в ходе каждой реакции используют дополнительные: «отрицательный» и «положительный» пробы. Отрицательный образец представляет собой воду и предназначен для выявления артефактов в ходе реакции. Наличие

амплификации в данной пробирке указывает на загрязнение реагентов или расходных материалов чужеродной ДНК. Положительный контроль представляет собой пробу, содержащую кДНК (ДНК), для которой в ходе предварительного изучения была получена достоверная амплификация. Отсутствие ПЦР-реакции в положительном образце указывает на некорректность при составлении ПЦР-смеси или программы амплификации. Кроме того, все изучаемые образцы кДНК предварительно анализируют на присутствие транскриптов контрольных EST-маркеров. В качестве EST наиболее часто выступают «гены домашнего хозяйства»: ACTB, Nu2BM, GAPD и др. Отсутствие амплификации или высокое значение Ct (>30 цикла) указывают на незначительное содержание кДНК в пробе или низкое качество образцов. Качество препаратов кДНК проверяется путем количественного анализа разведений. Для этого необходимо приготовить 5 вариантов разведений: 1:0, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625. В случае изменения угла наклона экспоненциальной части кривой вариантов (рис. 1), или если разница Ct между последними вариантами разведений выше, чем между первыми, то это однозначно указывает на низкое качество препарата кДНК (в частности, на наличие ингибиторов ПЦР).

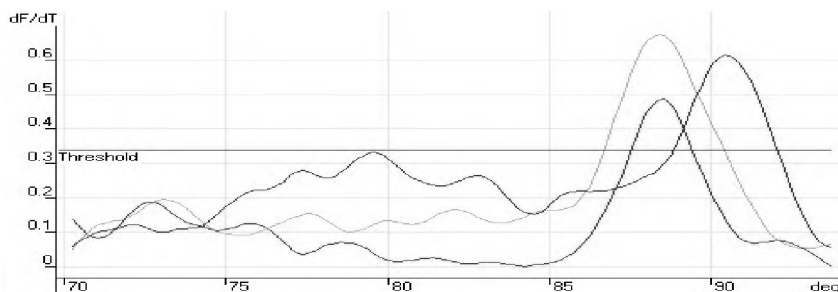


Номер	Цвет	Образец	Название гена	Ct	Концентрация	Разведение
1	■	710 б-м-D1	D1	37,20	0,1 нг/мкл	1
2	■	710 б-м-D1	D1	38,56	0,02 нг/мкл	5

Рис. 1. Анализ качества образцов кДНК методом разведения

Некачественные или контаминированные образцы кДНК и реагенты подлежат элиминации из работы. Специфичность амплификации в ходе выполнения SYBRGreen протокола производится с помощью оценки кривых плавления. В случае несовпадения температуры плавления выявляемого амликона с имеющимся стандартом (положительным контролем) или наличием более одного продукта амплификации результаты количественной оценки образца не засчитываются (рис. 2). Дополнительную верификацию

продуктов ПЦР-РВ также можно проводить с помощью метода геле-электрофореза. В случае несовпадения размеров выявляемых зон с расчетными, а также наличия нескольких фракций или повышенного фонового уровня неспецифичной амплификации в случае SYBRGreen протокола результаты количественной оценки также не засчитываются.

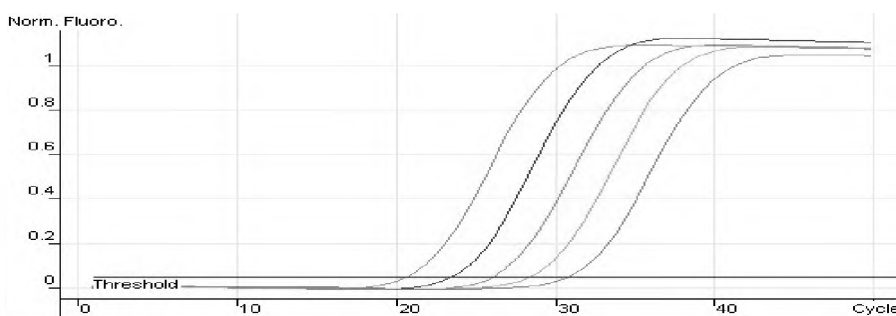


Номер	Цвет	Образец	Название гена	Температура плавления
1	■	Стандарт	B2	88,4
2	■	1121bz	B2	90,5
3	■	1689bz	B2	88,5

Рис. 2. Анализ кривых плавления ампликонов по гену B2

Интерпретация данных ПЦР-РВ

На первом этапе анализа необходимо определить значения показателя эффективности протекания ПЦР на экспоненциальной фазе для каждого выявляемого локуса. Для этого после первичного необходимо выбрать образец кДНК со значением C_t , равным 20–22 циклам и приготовить следующие варианты разведения: 1:0, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 (рис. 3).



Номер	Цвет	Образец	Название гена	C_t	Концентрация	Разведение
1	■	b-BK1	Циклин A1	20,98	250 нг/мкл	1
2	■	b-BK1	Циклин A1	23,56	50 нг/мкл	5
3	■	b-BK1	Циклин A1	26,14	10 нг/мкл	25
4	■	b-BK1	Циклин A1	28,53	2 нг/мкл	125
5	■	b-BK1	Циклин A1	31,07	0,4 нг/мкл	625

Рис. 3. Результаты ПЦР-РВ анализа титров образца b-BK1 по гену A1

Эффективность протекания реакции рассчитывается по формуле:

$$E = (R_2/R_1)^{1/(Ct_2 - Ct_1)},$$

где R — степень разведения образца;

Ct — цикл уровня пороговой флюоресценции (наиболее часто значение уровня пороговой флюоресценции находится в пределах 0,05–0,1 единиц флюоресценции).

При этом разница Ct между разведениями должна быть примерно одинаковой, в ином случае расчет эффективности амплификации для данного локуса будет недостоверным.

В случае эффективной амплификации коэффициент E должен стремиться к 2. Более низкое значение показателя эффективности амплификации (<1,7) указывает на необходимость оптимизации ПЦР — изменение программы амплификации, выбор праймеров другого типа, подбор соотношения реагентов ПЦР-смеси. Значение E, превышающее 2, говорит о наличии артефактов и высоком уровне погрешности при проведении измерений.

Исходя из методологических особенностей (весовых и гистологических различий исследуемых биоптатов, эффективности выделения РНК из разных проб и др.) препараты кДНК образцов изначально будут различаться по количественному содержанию продуктов обратной транскрипции. Для сопоставления получаемых данных экспрессии генов циклинов различных образцов на первом этапе обработки данных ПЦР-РВ проводят нормализацию (уравнивание) результатов по генам, характеризующихся относительно стабильным уровнем транскрипции в ткани, вне зависимости от ее физиологического состояния. В качестве таких нормализаторов обычно выступают гены, детерминирующие основные этапы метаболизма клетки — «гены домашнего хозяйства». Основными требованиями к выбору гена-нормализатора являются: применимость к данному типу ткани, сходное значение показателя эффективности амплификации с изучаемым геном-циклином. Для более точного сопоставления данных усреднение ведут по трем генам-нормализаторам. При этом изменения значений показателей Ct в разных образцах должны характеризоваться высокой степенью положительной корреляции.

Обработку данных выполняют с помощью специального программного обеспечения или на основании алгоритма:

- Среди анализируемых образцов выбирается контроль, экспрессия генов циклинов которых будет принята за 1. Наиболее оптимальным вариантом в качестве контроля является образец, характеризующийся наиболее низким средним значением Ct генов-нормализаторов. Следует отметить, что контроль должен присутствовать в качестве эталона при ПЦР-РВ анализе каждой партии для возможности проведения сравнительного анализа разных партий образцов.

- Для всех образцов рассчитывается среднее арифметическое значение Ct генов-нормализаторов — $Ct(h)$. Для i -образца оно обозначается как $Ct(h)_i$, контрольного образца — $Ct(h)_n$.

- Показатель отношения концентрации кДНК i -образца к контрольному образцу рассчитывается по формуле:

$$N = E_h^{(Ct(h)_i - Ct(h)_n)},$$

где E_h — среднее арифметическое значение показателя эффективности амплификации генов-нормализаторов.

Если $N > 1$, это означает, что изначальная концентрация кДНК в i -образце в N^{-1} раз меньше, чем в контрольном образце, и наоборот, если $N < 1$, то изначальная концентрация кДНК в i -образце в N раз больше, чем в контроле.

- Показатель экспрессии изучаемого гена циклина i -образца относительно контрольного образца рассчитывается по формуле:

$$S = (E_c^{(Ct(c)_n - Ct(c)_i)}) \times N,$$

где E_c — показатель эффективности амплификации изучаемого гена-циклина;

$Ct(c)_i$ — значение цикла уровня пороговой флюоресценции i -образца для изучаемого гена-циклина;

$Ct(c)_n$ — показатель цикла уровня пороговой флюоресценции контрольного образца для изучаемого гена-циклина;

N — отношение концентрации кДНК i -образца к контролю.

Если $S > 1$, это говорит о том, что уровень экспрессии изучаемого гена-циклина в i -образце в S раз больше по отношению к образцу-нормализатору, и наоборот, если $S < 1$, то уровень экспрессии изучаемого гена-циклина i -образца в S^{-1} раз меньше, чем в образце-нормализаторе.

Полученные данные об уровне относительной экспрессии генов-циклинов заносятся в базу данных для последующего анализа результатов.

Попарное сравнение многолокусных профилей экспрессии рядом находящихся образцов биоптатов позволяет оценивать состояние ткани по следующей формуле:

$$D(p, n) = (\sum (Sp_k - Sn_k)^2)^{1/2},$$

где Sn_k — показатель экспрессии k -гена циклина образца без признаков патологии;

Sp_k — показатель экспрессии k -гена циклина образца с признаками патологии.

Если коэффициент $D < 1,5$, это говорит о том, что уровень экспрессии

генов-циклинов находится в норме, $1,5 < D < 2,5$ указывает на начало развития патологических процессов, $D > 2,5$ — наличие онкологических клеток в образце.

При наличии большого количества сравниваемых биоптатов из одной ткани, результаты попарного сравнения вносятся в сравнительную матричную таблицу.

Далее, используя метод невзвешенного попарного среднего (UPGMA), следует провести сравнительный анализ образцов по следующей формуле:

$$D\left(\left(u, v\right), w\right) = \frac{T_u D_{u, w} + T_v D_{v, w}}{T_u + T_v}$$

где u , v , и k кластеры матрицы, содержащие T_u , T_v и T_k объектов, соответственно. Кластер k образован путем объединения кластеров u и v , тогда $T_u + T_v = T_k$. w — кластер, с которым проходит дистанция от кластера k .

Графическое отображение результатов кластеризации производится путем построения дендрограммы (рис. 4).

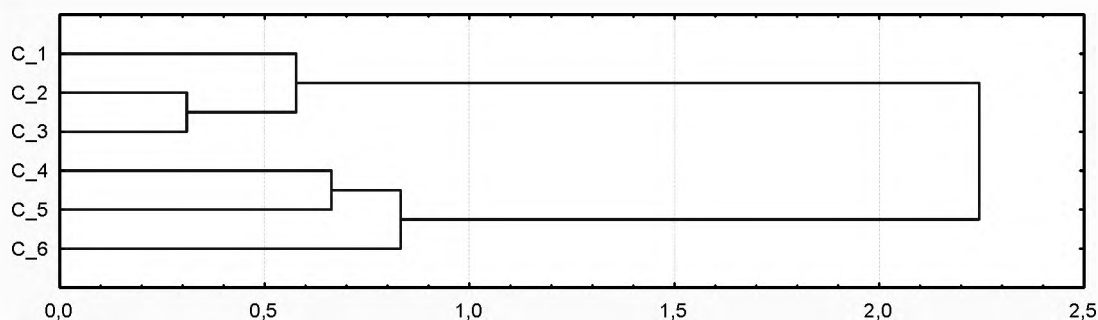


Рис. 4. Результаты сравнительного анализа экспрессии нормальных (1, 2, 3) и патологических (4, 5, 6) образцов изучаемой ткани

Сравнительный анализ уровня экспрессии также можно проводить и с помощью специального программного обеспечения GeneXpro, Express Gene и др. Статистический анализ и построение дендрограмм можно выполнить с помощью программного пакета Statistica.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. В настоящее время методы определения экспрессии генов доступны не всем лабораториям, даже имеющим амплификаторы, позволяющие проводить верифицированный количественный анализ экспрессии. Существует множество факторов, устранение которых является сложной задачей для многих лабораторий, пытающихся осуществлять такие исследования. Очень важен контроль забора материала, ошибки при котором

могут способствовать изменениям при анализе выборки, затрудняя или делая полностью невозможным сравнительный анализ между экспериментами. Кроме того, изменчивость может быть связана с методикой выделения РНК и эффективностью обратной транскрипции. Также ошибки связаны с деградацией РНК в образцах при хранении (мы используем специальный консервант или храним образцы в жидком азоте) и возможным загрязнением при выделении. Эффективность обратной транскрипции может измениться из-за полученной концентрации и целостности РНК при выделении и опять же зависит от используемых реактивов и присутствия загрязнителей. Простой спектрофотометрический анализ — измерение поглощения на 260 нм (A_{260}) не может определить целостность молекулы РНК, так как и целая и деградированная РНК показывает одинаковый уровень поглощения, таким образом можно только определить количество полученного материала. Кроме того, на старте необходима нормализация выборок, подразумевающая одинаковое количество и качество стартового материала в каждой выборке. Для решения этой задачи существует несколько способов, например использование генов с постоянным уровнем экспрессии (β -актин, GAPDH, beta-2-microglobulin, 18S и некоторые другие) в зависимости от типа исследуемых клеток.