

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
10 апреля 2009 г.
Регистрационный № 009-0209

**ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНОВ
ПО ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТОДОМ ПЦР
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Л.П. Титов, канд. биол. наук О.О. Янович

Минск 2009

Настоящая инструкция предназначена для определения активности системы интерферонов у больных хроническими инфекционными, аутоиммунными, аллергическими заболеваниями и при иммунодефицитах.

Инструкция предназначена для специалистов клинических и научно-исследовательских учреждений Республики Беларусь.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Раствор фиколл-верографин с градиентом плотности 1,077 г/мл.
2. 3% раствор ЭДТА.
3. Пробирки для забора крови.
4. 0,85% раствор хлорида натрия.
5. Среда RPMI-1640.
6. Телячья эмбриональная сыворотка.
7. L-глутамин.
8. Пируват натрия.
9. NEPES.
10. Гентамицин.
11. Набор для выделения РНК из клеток крови.
12. Набор для проведения реакции обратной транскрипции.
13. Ледяная уксусная кислота.
14. Хлороформ.
15. Изопропанол.
16. 75% этанол.
17. Набор для проведения ПЦР с красителем SYBR Green.
18. Термостат с 5% CO₂.
19. Центрифуга 1500 об/мин.
20. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.
21. Одноразовая пластиковая посуда (микропробирки для ПЦР на 0,2; 0,5; 1,5 мл).
22. Отдельные наборы автоматических пипеток переменного объема.
23. Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.
24. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (с аэрозольным барьером).
25. Холодильник на 2–8 °С с морозильной камерой.
26. Твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл.
27. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 10 тыс. об/мин.
28. Вортекс-шейкер.
29. Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени.
30. Компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме реального времени, хранения данных и анализа.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РРВ)

Основные принципы ПЦР-РРВ:

1. ПЦР-РРВ — это комплекс методик проведения количественной ПЦР с определением выхода продукта реакции после каждого цикла амплификации и определением относительной концентрации субстрата на основании анализа кинетической кривой ПЦР.

2. Полуколичественный метод проведения ПЦР-РРВ не требует построения калибровочной кривой и оценивает изменение экспрессии гена относительно базовой линии. В качестве нормализера (для устранения ошибок, связанных с различной концентрацией образцов) используется ген с постоянным уровнем экспрессии в различных тканях организма. Одним из таких генов является β -актин.

3. Все системы ПЦР в реальном времени основаны на обнаружении флуоресцентного сигнала, который увеличивается прямо пропорционально продуктам ПЦР в реакции. Самым простым и экономичным является метод использования интеркалирующего красителя SYBR Green, который связывается с двухцепочечной ДНК.

4. После проведения реакции прибор дает возможность проверить специфичность образовавшегося продукта реакции по кривым плавления. Точка плавления конечного продукта зависит от длины ампликона и его нуклеотидного состава. Обнаружение более одного пика показывает, что образовались неспецифические продукты реакции.

Преимущества ПЦР-РРВ

- возможность использовать небольшие клинические образцы;
- высокая чувствительность метода (менее 5 копий ДНК);
- отсутствие необходимости проведения электрофореза, т.е. снижение риска контаминации;
- возможность количественной оценки экспрессии гена;
- возможность наблюдения накопления продукта ПЦР в реальном времени и изменение продолжительности реакции в зависимости от накопления продуктов ПЦР (уменьшение или увеличение количества циклов).

Этапы проведения ПЦР-РРВ

При каждой операции используют и меняют одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером, работают в одноразовых перчатках.

Выделение мононуклеаров периферической крови из цельной крови

Выделение мононуклеаров проводилось на градиенте плотности фиколл-верографин (1,077 г/мл). Раствор фиколл-верографин с указанным градиентом плотности покупается готовым.

Кровь 4–5 мл забирают путем пункции локтевой вены утром, натощак, в стерильные пробирки с 3% раствором ЭДТА (соотношение 1 часть ЭДТА и

20 частей крови). Проведение реакции необходимо осуществить в течение 3 ч с момента забора крови.

Цельную кровь разводят в два раза 0,85% раствором хлорида натрия, настилают на градиент плотности ($1,077 \text{ г/см}^3$) и центрифугируют 30–40 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре. Соотношение объемов градиента плотности и разделяемой суспензии должно быть 1:2–1:3. В результате центрифугирования образуются следующие фракции:

- на дне пробирки — эритроциты;
- фракция полиморфно-ядерных лейкоцитов сосредотачивается в виде тонкого слоя непосредственно между фазой эритроцитов и фазой градиента;
- бесцветный слой градиента;
- фракция мононуклеарных клеток — между слоями плазмы и градиентом;
- слой жидкости желто-розового цвета (плазма).

Клетки осторожно собирают пипеткой. Осадок отмывают дважды 0,85% раствором хлорида натрия или раствором Хенкса, центрифугируя 10 мин при 1500 об/мин и удаляя надосадок. Полученные клетки ресуспендировали в полной среде RPMI-1640, подсчитывали в камере Горяева и доводили суспензию до 1 млн лимфоцитов/мл.

Выделение РНК из мононуклеаров периферической крови

РНК из клеток крови выделяется стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения РНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделение РНК проводится гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформной экстракцией.

Принцип метода основан на том, что РНК отделяется от ДНК после экстракции кислым раствором, содержащим гуанидин тиоционат, ацетат натрия, фенол и хлороформ, при центрифугировании. При кислых условиях РНК остается в верхней водной фазе, в то время как большая часть ДНК и белков остаются или в межфазе, или в более низкой органической фазе. Далее РНК осаждается изопропиловым спиртом и промывается 70% этанолом.

Образцы РНК хранятся при $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение месяца.

Проведение реакции обратной транскрипции

Для получения кДНК в качестве матрицы применяют образцы РНК с проведением реакции обратной транскрипции, используя коммерческий набор по инструкции производителя. Готовится смесь: 2 мкл 10x-буфера; 0,5 мкл 50 ЕдU/мкл обратной транскриптазы; 4,4 мкл MgCl_2 25 мМ; 4,0 мкл дНТФ 2,5 мМ; 2 мкл олигод(T) 50 μM ; 0,4 мкл ингибитора рибонуклеазы 20 Ед/мкл; 1,7 мкл деионизированной воды и 5 мкл РНК.

Стимуляция мононуклеаров периферической крови

В лунку культуральной 24-луночной планшеты добавляется 80 мкл клеток и 2 мл полной питательной среды для культур клеток. Полную питательную среду для культур клеток готовили из жидкой питательной среды RPMI-1640 с 10% телячьей эмбриональной термоактивированной сывороткой с добавлением 0,3 г/л L-глутамина, 0,11 г/л пирувата натрия, 15–

25 мМ HEPES и 50 мг/л гентамицина. Обработку клеток проводили препаратом циклоферон в концентрации 100 мкг/мл, ФГА в концентрации 10 мкг/мл в течение 24 ч при температуре 37 °С в атмосфере с 5% CO₂.

Полученные клетки проходят стадии выделения РНК из мононуклеаров и реакции обратной транскрипции.

Проведение ПЦР-РРВ

ПЦР-РРВ осуществляли с использованием набора для проведения ПЦР с красителем SYBR Green.

Праймеры синтезируются под заказ. Для удобства готовится матричный раствор с концентрацией праймеров 10 пМ/мкл.

Готовится смесь: 10 мкл ПЦР-смеси с красителем SYBR Green; по 1 мкл прямого и обратного праймеров; 2 мкл кДНК и 6 мкл деионизированной воды. Общий объем амплификационной смеси составляет 20 мкл.

Таблица 1

Последовательность праймеров для определения экспрессии генов интерферонов

Ген	Последовательность праймера
ИФ-α	F – 5-GTTCCTCAGCCTCTTCTCCT R – 5- ATCTATCTGGGAGGGGTCTT
ИФ-β	F – 5-AGATGGTCAATGCGGC R – 5- AGGAGTACAGTCACTGTG
ИФ-γ	F – 5-TCTGCATCGTTTTGGGTTCT R – 5- GCAGGCAGGACAACCATTACT
ИФ-α рецептор	F – 5-AGTGATGAGCAAGCAGTAA R – 5- AGGTTAGGAAAT GGCCAG
ИФ-γ рецептор 1	F – 5-CCCGAAACTACCTGTTACATTAGG R – 5- CCAAAGAGAACSTTTTATACTGCTAT
ИФ-γ рецептор 2	F – 5-GCTCAGTGGAGGCATCTGC R – 5- CTCCTTTGACATCGCTGATAC
β-актин	F – 5-CGACAGGATGCATGCAGAAGGAGA R – 5- CGTCATACTCCTGCTTGCTG

Пробирки переносятся в прибор для проведения ПЦР-РРВ, проводится амплификация в автоматическом режиме по заданной программе. Количество циклов амплификации и температурный режим указаны в табл. 2.

Программы амплификации

Ген/позиция	Шаг	Температура	Время
ИФ- α	40 циклов	50 °С	2 мин
		95 °С	10 мин
		95 °С	15 с
		60 °С	80 с
		72 °С	30 с
ИФ- β	40 циклов	95 °С	10 мин
		95 °С	15 с
		54 °С	50 с
		72 °С	30 с
ИФ- γ	40 циклов	50 °С	2 мин
		95 °С	10 мин
		95 °С	15 с
		52 °С	70 с
		72 °С	30 с
ИФ- α рецептор	40 циклов	50 °С	2 мин
		95 °С	10 мин
		95 °С	15 с
		50 °С	70 с
		72 °С	30 с
ИФ- γ рецептор 1 и ИФ- γ рецептор 2	40 циклов	50 °С	2 мин
		95 °С	10 мин
		95 °С	15 с
		58 °С	70 с
		72 °С	30 с
β -актин	40 циклов	50 °С	2 мин
		95 °С	10 мин
		95 °С	15 с
		58 °С	50 с
		72 °С	30 с

Анализ полученных данных**Определение относительной экспрессии генов:**

Уравнение, используемое в большинстве методов анализа данных ПЦР в режиме реального времени, основано на формуле, описывающей ПЦР амплификацию в экспоненциальной фазе реакции:

$$X_n = X_0 \times (E + 1)^n, \quad (1)$$

где X_n — количество ПЦР продукта в цикле n ,
 X_0 — начальное количество ДНК,

E — эффективность амплификации.

При ПЦР реакции с использованием флуоресцентного красителя накопление данного красителя пропорционально накоплению ПЦР продукта, и уравнение (1) может быть представлено как:

$$R_n = R_0 \times (E + 1)^n, \quad (2)$$

таким образом, начальная флуоресценция определяется как:

$$R_0 = R_n / (E + 1)^n, \quad (3)$$

где R_n — интенсивность флуоресценции в цикл n ,

R_0 — теоретическая начальная флуоресценция, которая пропорциональна начальному количеству вносимого ДНК.

Проводится измерение C_t (threshold) — точка, в которой флуоресценция достигает значений выше фоновых величин. Далее в уравнении (3) n на C_t :

$$R_0 = R^{C_t} / (E + 1)^{C_t}. \quad (4)$$

R_{C_t} представляет собой threshold, который устанавливается для каждой реакции или может быть общим для всех сравниваемых реакций. В этом случае уравнение (4) приобретает вид:

$$R_0 = 1 / (E + 1)^{C_t}. \quad (5)$$

При использовании полуколичественного метода необходимо убедиться, что эффективность реакции для образца и хаускипинг-гена равны. В экспоненциальной фазе амплификационной кривой проводится изменение флуоресценции R_1 — нижнее значение и R_2 — верхнее значение и соответствующие значения C_t . Для измерения используется логарифмический график амплификационной кривой, так как на нем легко определить экспоненциальную фазу (рис.).

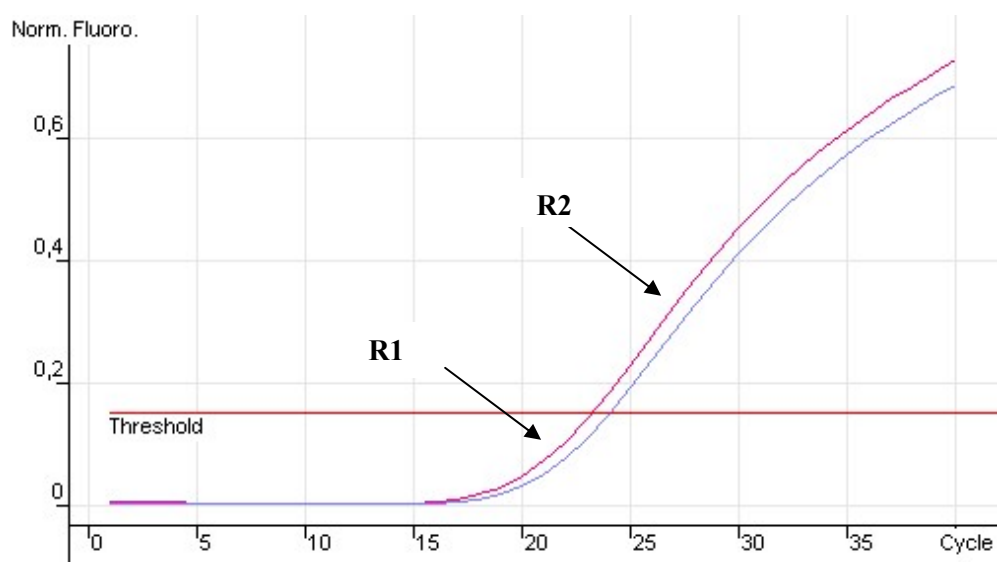


Рис. Подсчет эффективности амплификации по кинетической кривой ПЦР

Амплификационная эффективность (E) каждой реакции подсчитывается по уравнению:

$$E = (R2/R1)^{1/(Ct2-Ct1)} \quad (6)$$

Конечным этапом определения относительной экспрессии гена является нормализация. Для нормализации полученных данных использовался хаускипинг-ген — β -актин.

$$\text{Относительная экспрессия гена} = R_{0x}/R_{0\beta} = (1 / (E+1)^{Ct_x}) / (1 / (E+1)^{Ct_\beta}) \quad (7)$$

Для определения влияния препарата на экспрессии генов используется следующая формула:

$$\text{Изменение экспрессии гена} = 2^{-(\Delta Ct \text{ интерферон} - \Delta Ct \beta\text{-актин})} \quad (8)$$

где $\Delta Ct \text{ интерферон} = C_t \text{ клеток после стимуляции} - C_t \text{ нестимулированных клеток}$,

$\Delta Ct \beta\text{-актин} = C_t \beta\text{-актин клеток после стимуляции} - C_t \beta\text{-актин нестимулированных клеток}$.

Определение специфичности проведенной реакции

После реакции ПЦР-РРВ проводится анализ кривых плавления. На специфичность реакции указывает наличие одного специфического пика плавления.

Оценка полученных результатов

1. После проведения реакции необходимо установить threshold, который будет применяться далее для всех реакций. На уровне этого threshold определить значение C_t для образца и для β -актина.

2. Определение эффективности реакции, как указано выше. При правильной постановке реакции эффективность равна 1.

3. Ввести все данные в формулу (7) и получить результат.

4. Для определения эффективности препарата использовать формулу (8). Полученное значение указывает на степень изменения экспрессии гена под воздействием препарата.