



Подбор индивидуального праймера и оптимизация условий проведения полимеразной цепной реакции для обнаружения гена GFP (green fluorescent protein)

Н.В. Касинская, С.Е. Деньгина, О.И. Степанова, Ю.В. Фокин

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Касинская Наталья Владимировна M-Sklad@yandex.ru

Впервые получен праймер и адаптирована программа его работы для ПЦР-диагностики гена зеленого белка (GFP). Моделями исследования служили мыши линии B10.GFP из коллекционного фонда НЦМБТ РАМН. Данный праймер позволит быстро и качественно с помощью ПЦР-метода определить наличие или отсутствие гена GFP в любом искомом образце ДНК, принадлежность к линии лабораторных животных, имеющих в геноме данный ген GFP. Он также удобен для работы в области трансплантологии (позволяет определить наличие или отсутствие донорских клеток в тканях реципиента).

Ключевые слова: ген GFP, праймер, мыши B10.GFP, амплификация, температура отжига.

В настоящее время флуоресцентные белки являются незаменимым инструментом для изучения процессов, протекающих внутри живых клеток. GFP (green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок, или белок зеленой флуоресценции) был обнаружен Shimomura с соавт. в 1962 г. у люминесцирующей медузы *Aequorea victoria*. Ген GFP был клонирован в 1992 г. Prasher и соавт., и уже через несколько лет началось активное использование этого гена как репортерного в работах с самыми разными про- и эукариотическими организмами. Сейчас ген GFP применяется в сотнях работ во всем мире, и число их стремительно возрастает. Столь быстрый рост вызван особыми свойствами белка GFP, а именно его способностью флуоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при об-

лучении длинноволновым УФ. Эта флуоресценция обусловлена непосредственно белком, для ее проявления не требуется субстратов или кофакторов. Благодаря этому свойству ген GFP является очень перспективным геном, позволяющим проводить разнообразные прижизненные (недеструктивные) исследования с трансгенными организмами. А получение в 2008 г. Нобелевской премии по химии О. Симомуре, Р. Тсьеню и М. Чалфи за открытие и применение зелёного флуоресцентного белка показывает, насколько актуальны работы в данном направлении.

В результате клонирования гена зеленого флуоресцирующего белка и внедрения его в геном кишечной палочки (*Escherichia coli*) [3] был получен белок в количестве, нужном для его исследований, в том числе для расшифровки аминокислотной последо-

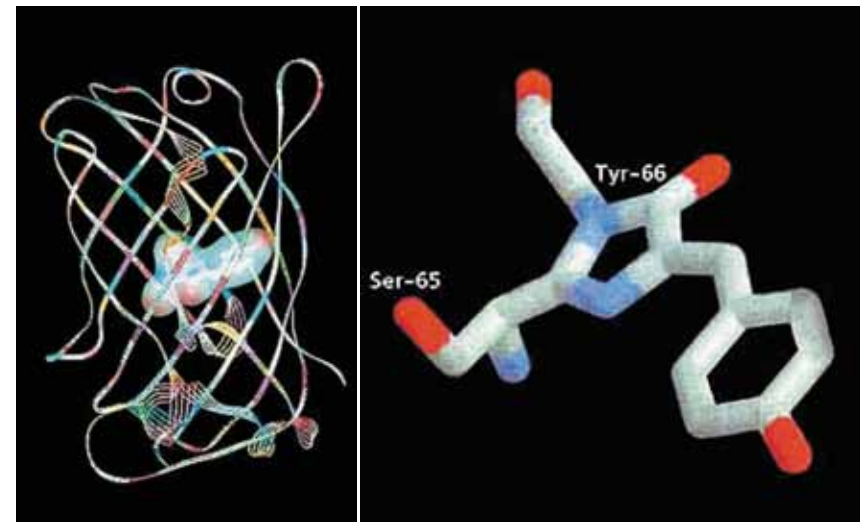


Рис. 1. Схема строения молекулы зеленого флуоресцирующего белка (справа) и ее хромофорной группы [1].

вательности, и выявлены совершенно уникальные особенности GFP. Оказалось, он, в отличие от всех до того известных окрашенных и флуоресцирующих белков (хромопротеидов: фикобиллинов, фикоэритринов, каротенопротеинов), для обретения оптических свойств не нуждается в какой-либо внешней хромофорной группе или в солях тяжелых металлов. Извне для его «созревания» – появления яркой зеленой флуоресценции – требуется только молекулярный кислород. Этот процесс длится довольно долго. Детектируемая флуоресценция появляется через 1,5 ч после синтеза, а достигает максимума только через несколько часов. При «созревании» в пептидной цепи белка образуется р-гидроксibenзилиден-имидазолиновое кольцо из трех аминокислотных остатков, следующих друг за другом: серина-65, тирозина-66 и глицина-67 (рис. 1). Это кольцо и служит хромофорной группой. В ходе такой реакции Тир-66 автокаталитически дегидрируется и окисляется молекулярным кислородом. Не вошедшая в состав хромофора часть пептидной цепи белка скручивается в подобие бочки или клетки, внутри которой помеща-

ется хромофор. Стенки «бочки» образованы 11 β-складками, а крышка, дно и связки с хромофором – α-спиральными участками белковой молекулы [1].

На общей схеме видно, что молекула имеет форму бочки, внутри которой заключены аминокислоты серин-65, тирозин-66 и глицин-67, образующие хромофор.

Для обнаружения гена зеленого белка GFP в ДНК донорских клеток костного мозга и отслеживания поведения этих клеток после их трансплантации реципиентам применялся метод ПЦР, являющийся одним из основных методов современной молекулярной генетики. С его помощью можно специфически амплифицировать любой известный ген. Его использование дает возможность достичь больших успехов в области генетического картирования, изучения генетического полиморфизма, мутаций и генетических механизмов в молекулярной иммунологии, в молекулярной вирусологии, онкологии, судебной медицине, диагностике наследственных и инфекционных заболеваний, в трансплантологии.

Идентифицировать трансплантируемые клетки можно с помощью получения кри-

осрезов органов и тканей проведения фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии клеточного материала, но ПЦР, со своей высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет гарантированно быстро и надежно получить результат.

Целью настоящего исследования является подбор, синтез и адаптация работы праймеров для проведения полимеразной цепной реакции.

Для постановки ПЦР необходимо решить следующие задачи:

1. определить температуру отжига праймера;
2. определить концентрацию веществ в рабочей смеси.

Для этого необходимо:

- минимальное количество ДНК, имеющего в наличии ген GFP;
- образец ДНК, в которой нет этого гена;
- пара олигонуклеотидов (праймеров), ограничивающая искомым ген;

Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфичного фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

- термостабильная ДНК-полимераза – фермент, участвующий в синтезе двухцепочечной ДНК;
- набор из четырех нуклеотидов для формирования новой цепочки ДНК дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- ионы Mg, необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции – pH, ионную силу раствора.

Важнейшей характеристикой праймеров является температура плавления, при которой половина ДНК-матриц образует

комплекс с олигонуклеотидным праймером. Температуру плавления можно приблизительно определить по формуле:

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C),$$

где nX – количество нуклеотидов X в праймере.

Материалы и методы

Настоящий эксперимент проводился в НЦБМТ РАМН. Нами были использованы: экспериментальная группа – 150 мышей линии B10.GFP (полученные от скрещивания мышей линии C57BL/10SnY и мышей линии C57BL/6-TgN (ACTbEGFP) 10sb-Jackson Laboratory, предоставленные нам лабораторией Osb-Jackson – США) и контрольная группа – 40 голов мыши линии C57BL/6.

Нуклеотидная последовательность гена была определена с помощью первичных баз данных и программы обработки [2].

Эксперимент проводился в три этапа:

1. Выделение ДНК из пробы печени мышей при помощи набора Diatom DNA Prep 100 (ООО «Компания Биокон», Россия), по инструкции фирмы-производителя.
2. Амплификация геномной ДНК (в термоциклере «Терцик», компания «ДНК-Технология», Россия).
3. Идентификация ПЦР продуктов методом горизонтального электрофореза. Гели сканировали в ультрафиолетовом свете при помощи трансиллюминатора GellChemi Doc («Bio-Rad» США). Наличие в геле полосы ДНК соответствующего размера свидетельствует о наличии в образце искомого гена.

1 этап: ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

- 1.1. Приготовление рабочего раствора солевого буфера. Содержимое

флакона с 10-кратным солевым буфером (10 мл) переносим в мерный цилиндр, доводим бидистиллированной водой до метки 100 мл и 96% этиловым спиртом до метки 300 мл, перемешиваем.

- 1.2. В пробирку объемом 1,5 мл вносим 100 мкл исследуемой пробы, добавляем 400 мкл лизирующего реагента, перемешиваем содержимое пробирки переворачиванием (5-10 раз).
- 1.3. Термостатируем пробирку со смесью 5-7 мин. при температуре 65°C.
- 1.4. Проводили центрифугирование пробирки со смесью 10 сек. при 5000 g. Прозрачный супернатант целиком перенесли в чистую пробирку.
- 1.5. В пробирку с чистой смесью добавили 20 мкл суспензии сорбента NucleoS.
- 1.6. Пробирку помещали на ротатор и перемешивали 10 мин. (10-20 об./мин)
- 1.7. Центрифугировали 10 с при 5000 g.
- 1.8. Удалили супернатант с помощью водоструйного насоса.
- 1.9. К осадку добавили 200 мкл лизирующего реагента, перемешали на вортексе до полного гомогенного состояния.
- 1.10. Добавили в пробирку 1 мл рабочего раствора солевого буфера.
- 1.11. Перемешали содержимое пробирки переворачиванием 5-10 раз.
- 1.12. Центрифугировали 10 с при 5000 g.
- 1.13. Удалили супернатант с помощью водоструйного насоса.
- 1.14. Добавили в пробирку 1 мл солевого буфера, перемешали содержимое пробирки на вортексе, центрифугировали 10 с при 5000 g и удалили супернатант с помощью насоса.
- 1.15. Просушили осадок при температуре 65°C в течение 4-5 мин.
- 1.16. В эту же пробирку внесли 50-100 мкл ЭкстраГена.

- 1.17. Суспендировали содержимое пробирки на вортексе 5-10 с до получения гомогенной суспензии, затем термостатировали 4-5 мин при 65°C.
- 1.18. Центрифугировали 1 мин при 10000 g.

2 этап: АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК

Амплификацию геномной ДНК проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия).

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала:

- 1,0 мкл геномной ДНК;
 - 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы;
 - 2,5 мкл 10x буфера;
 - 2,5 мкл 25 mM хлорида магния;
 - 0,5 мкл 10 mM dNTP;
 - 0,5 мкл 10 M primers;
- 1-я пара -
5'-CACATGAAGCAGCACGACTTCT-3'
5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGA T-3'
- 2-я пара –
5'-CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTCT-3'
5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGA T-3'
- 17,8 мкл воды.

Протокол амплификации включал:

- 1 цикл: 94°C – 3 мин;
- 38 циклов: 94°C – 15 с;
- 62°C – 30 с;
- 72°C – 30 с.

3 этап: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЦР-ПРОДУКТОВ

Гель-электрофорез – стандартный метод разделения смеси молекул ДНК по размеру. Он основан на том, что молекулы ДНК в растворе заряжены отрицательно и под действием электрического поля движутся к аноду. Поры геля обладают эффектом сита, в результате малые молекулы движутся к аноду быстрее, чем большие. Разделяющая способность геля зависит от размера пор, который, в свою очередь, зависит от концентрации

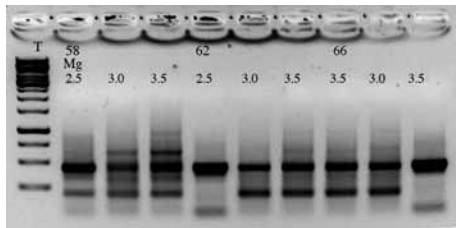


Рис. 2. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймером B.10GFP, ДНК мыши линии B.10GFP.

- 1 – маркер молекулярной массы 100b;
- 2 – спектр продуктов амплификации при $t = 58^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 2,5$ мкл;
- 3 – спектр продуктов амплификации при $t = 58^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,0$ мкл;
- 4 – спектр продуктов амплификации при $t = 58^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,5$ мкл;
- 5 – спектр продуктов амплификации при $t = 62^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 2,5$ мкл;
- 6 – спектр продуктов амплификации при $t = 62^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,0$ мкл;
- 7 – спектр продуктов амплификации при $t = 62^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,5$ мкл;
- 8 – спектр продуктов амплификации при $t = 66^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 2,5$ мкл;
- 9 – спектр продуктов амплификации при $t = 66^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,0$ мкл;
- 10 – спектр продуктов амплификации при $t = 66^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,5$ мкл.

геля. Положение отдельных молекул ДНК при электрофорезе в агарозных гелях выявляют с помощью интеркалирующего красителя – бромистого этидия, который образует с фрагментами ДНК прочные соединения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде светящихся полос.

Протокол проведения электрофореза и детекции продуктов ПЦР.

Электрофорез проводили с помощью комплекта реагентов № 2 «ДНК-Технология» по инструкции к применению. Для приготовления рабочего раствора буфера для электрофореза содержимое пакета с надписью «Буфер для электрофореза» полностью переносили в мерную колбу, растворяли в 600-800 мл дистиллированной воды и доводили объем полученного раствора до 1 л дистиллированной водой. Приготовление агарозного геля. Содержимое одного из пакетов с надписью «Агароза» полностью переносили в коническую стеклянную колбу на 250-500 мл, прибавляли 150 мл рабо-

чего раствора буфера для электрофореза и перемешивали. Суспензию агарозы в колбе доводили до кипения в СВЧ-печи периодически помешивая. Расплав охлаждали до $55-60^\circ\text{C}$, затем прибавляли 10 мкл раствора бромистого этидия и перемешивали. Наливали расплав агарозы на столик для заливки геля. Столик с готовым агарозным гелем и гребенками переносили в камеру для электрофореза, куда был налит рабочий раствор буфера для электрофореза. Проведение электрофореза. Из-под слоя минерального масла отобрали 10 мкл ПЦР-смеси и перенесли в карман гелевой пластины. Туда же внесли 2-3 мкл краски-лидера. Подключили прибор к источнику напряжения, соблюдая полярность электродов, и учитывая, что движение фрагментов ДНК происходит в направлении от катода к аноду. Установили напряжение около 120 В. По окончании электрофореза источник напряжения отключили. Агарозный гель перенесли на УФ-фильтр трансиллюминатора GellChemi Doc («Bio-Rad» США) для детекции. Производили визуализа-

цию и регистрацию полученных результатов с помощью программы «Quantity One».

Результаты и их обсуждение

Подобраны оптимальные условия работы праймера гена GFP. Полимеразная цепная реакция проводилась при указанных выше величинах компонентов реакционной смеси, изменению подвергались температура отжига праймера, а также концентрация хлорида магния. Амплификацию проводили при температуре отжига праймера: 58°C , 62°C , 66°C . Концентрацию магния в первом варианте брали – 2,5 мкл, втором – 3,0 мкл, третьем – 3,5 мкл. Были получены электрофоретические спектры продуктов амплификации, проанализировав которые можно сказать, что оптимальная температура отжига – 62°C , и концентрация $\text{MgCl}_2 = 2,5$ мкл 25 мМ (рис. 2). При этих величинах специфическая полоса наиболее отчетлива и показательна (трек 5). Таким образом, мы получили праймер и программу амплификации, которые позволили определить наличие гена GFP в экспериментальной группе мышей B.10GFP для их генотипирования, т.е. их соответствие данной линии. Новый полученный праймер дает возможность подтверждать наличие или отсутствие искомого гена.

Данный праймер и программа амплификации могут быть использованы для разных научных целей в генетике и в трансплантологии как более точный метод для визуализации донорских клеток.

Выводы

Впервые подобран и адаптирован индивидуальный праймер на ген зеленого белка GFP.

Подобрана программа амплификации с этим праймером.

С помощью данного праймера можно проводить генотипирование линии мышей B.10GFP.

Полученный праймер позволит осуществить качественный анализ при выявлении донорских клеток с геном зеленого белка в организме реципиента и может быть использован в трансплантологии.

Список литературы

1. Лабас Ю.А., Гордеева А.В., Фрадков А.Ф. Флуоресцирующие и цветные белки. М.: Природа. 2003. № 3 С. 33-43.
2. Примроуз С., Тваймен. Р. Геномика. Роль в медицине. Перевод с английского канд. хим.наук О.Н. Королевой. М.: Бином. Лаборатория знаний. 2008. С. 58-59.
3. Prasher D.C., Eckenrode V.C., Ward W.W. et al. // Gene. 1992. V. 111. P. 229-233.

Selection of individual primer and optimization of conditions of carrying out chain reaction for gene GFP (green fluorescent protein) detection

N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina, O. I. Stepanova, Yu.V. Fokin

Primer for polymerase chain reaction (PCR) was received. This method allows genetic typing a gene of green protein at transgene mice of line B10.GFP and opens possibility for search of donor cells with a label of a gene of green protein at recipients after their transplantation, as more exact method.

Key words: gene GFP, primer, mice B10.GFP, amplification, annealing temperature.