

Молодежный инновационный проект №10-4-ИП-72

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛЬЦЕВЫХ ДНК А-ЦЕПИ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА

Сайдакова Е.В.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь,
ул. Голева, д.13.*

E-mail: radimira@list.ru

Цель работы – создание тест-системы на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени для количественного определения α TREC в лимфоцитах периферической крови людей.

Методы и подходы, использованные в ходе выполнения проекта.

Материалом для исследований послужила периферическая венозная кровь людей разного пола и возраста. Выделение ДНК проводили из 0,5 мл цельной крови с использованием набора реагентов «KR-012» фирмы “OMNIX” (Россия) согласно инструкции производителя. Генетический материал хранился при -20°C до момента использования, но не более 1 месяца.

Для осуществления относительного количественного анализа был получен стандартный калибровочный образец ДНК (концентрация 165 мкг/мл, соотношение показателей светопоглощения на длинах волн 260 и 280 нм – 1,83).

Аmplификация целевого и референсного генов проводилась отдельно. В пробирки, содержащие готовую реакционную смесь (M-437-200, “Синтол”, Россия), вносили по 0,5 мкл прямого и обратного праймеров (10 пкмоль/мкл) к последовательностям α TREC (прямой: 5'-CACATCCSTTTCAACCATGCT; обратный: 3'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG) или референсного гена, по 0,5 мкл (10 пкмоль/мкл) флуоресцентных зондов, соответственно, «TCR2 зонд» (FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCACT-BHQ1) или «зонд референсного гена» и по 5 мкл раствора образца. Общий объем реакционной смеси – 25,0 мкл – достигался добавлением деионизированной воды. На возможность использования в качестве референса проверена геномная последовательность β -актина (набор 401846 – β -actin control reagents, “Applied Biosystems”, США). Реакцию осуществляли по программе: 95°C – 180 сек, 1 цикл; 61°C – 20 сек, 70°C – 10 сек, 95°C – 15 сек, 50 циклов. Измерение уровня флуоресценции проводили при температуре 61°C в каждом цикле амплификации.

Детекцию результатов классической ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза в 2% геле агарозы. Участок геля, соответствующий амплифицированному фрагменту ДНК, вырезали при визуальном контроле в ультрафиолетовом свете.

Математический анализ проведен методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Достоверность различий между группами оценивалась на основе *t*-критерия Стьюдента. Критерии непараллельности кривых определены на основе дисперсионного анализа для двух рядов регрессии.

Важнейшие результаты, полученные за отчетный период.

1. Исследована возможность реализации методов абсолютного и относительного количественного анализа кольцевых ДНК Т-клеточного рецептора с помощью ПЦР в реальном времени.
2. Разработана схема создания необходимых для реализации метода абсолютного количественного анализа стандартов: плазмид со специфическими вставками α TREC и гена альбумина. Проверены альтернативные варианты создания стандартов.
3. Реализован метод относительного количественного анализа, требующего для расчетов данные о пороговом цикле амплификации референсного гена. В серии экспериментов показано, что геномная последовательность β -актина может быть использована в качестве референса так как эффективность ее амплификации совпадает с таковой α TREC ампликона.
4. На основе разработанного метода проведен перекрестный анализ изменений продуктивной функции тимуса женщин на разных сроках беременности (10-4-НП-231).
5. Показано, что в течение полугода все компоненты созданной тест-системы сохраняют свою работоспособность.

Основные публикации по проекту

1. Сайдакова Е.В., Шмагель К.В. Функциональная активность тимуса женщин во время беременности, Вестник уральской медицинской академической науки, 2011, Т.38, №4/1, С.148.
2. Сайдакова Е.В., Шмагель К.В. Создание стандартной калибровочной кривой для абсолютного количественного анализа кольцевых ДНК α -цепи Т-клеточного рецептора, тезисы VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток», 2011, принято к публикации.