

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ПОЛУЧАЕМОЙ В ПРОЦЕССЕ ВЫДЕЛЕНИЯ

Судомоина Марина Анатольевна, к.б.н., sudom@inbox.ru

Введение

Этот обзор предназначен в первую очередь для тех, кто работает с материалом, выделение нуклеиновых кислот из которого является не всегда предсказуемым и однозначным. К таким материалам можно отнести:

- плазму (выделение циркулирующей нуклеиновой кислоты),
- мочу (выделение циркулирующей нуклеиновой кислоты),
- материалы, фиксированные в парафиновых блоках (выделение ДНК и/или РНК),
- образцы для судебно-медицинских исследований,
- клетки и ткани, в которых исследуется экспрессия единичных генов.

Наиболее распространенными методами оценки выделенных нуклеиновых кислот являются следующие методы:

1. электрофорез в акриламидном или агарозном геле,
2. спектрофотометрическая оценка по уровню поглощения,
3. флуориметрическая оценка с использованием флуоресцентных красителей,
4. гибридизация со специфическим зондом,
5. полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Способы оценки количества и качества нуклеиновых кислот без амплификации

Электрофорез в полиакриламидном или агарозном геле применяют для визуальной оценки количества и качества выделенной нуклеиновой кислоты. Для визуализации нуклеиновой кислоты в геле применяют различные методы:

Таблица 1. Сравнение различных методов визуализации нуклеиновых кислот

Методы визуализации	Название	Чувствительность метода
Интеркалирующие красители	бромид этидия (EtBr) SybrGreen I SybrGreen II SybrGold GelRed GelGreen	>1 нг
Красители, связывающиеся непосредственно с нуклеиновой кислотой	Diamond™ Nucleic Acid Dye, cat.# H1181 , Promega	>100 пг
Окраска серебром	нитрат серебра (AgNO ₃)	>10 пг
Радиоактивные изотопы	³² P	>1 фг

Измерение поглощения при 260 нм (A₂₆₀) для РНК и ДНК с использованием спектрофотометрии является общераспространенным и простым способом.

Как и любые методы измерения, метод спектрофотометрической оценки имеет определенные погрешности при использовании для оценки концентрации нуклеиновых кислот.

При анализе малых объемов, на результаты может влиять погрешность пипеток и присутствие в пробе примесей (соосадители, компоненты буферов, детергенты и т.п.). Так например, при выделении малых количеств нуклеиновых кислот часто

используют различные соосадители, возможное влияние которых на определение концентрации нуклеиновых кислот не всегда досконально изучено. Thermo Fisher Scientific Inc. исследовали влияние избытка соосадителей гликогена и Invitrogen™ GlycoBlue™ Coprecipitant (гликогена, ковалентно связанного с синим красителем) на точность измерения концентрации РНК на флуориметре Qubit™ 3.0 вблизи верхнего и нижнего рекомендованного предела концентраций. При этом обнаружено, что присутствие уже двукратного избытка GlycoBlue™ Coprecipitant по сравнению с количеством, рекомендованным производителем, искажает данные измерения для некоторых наборов реагентов на 10-20%¹. Для гликогена подобных отклонений не обнаружено, но при этом протестированный избыток гликогена составлял только 20% от рекомендованного производителем количества. Понятно, что при добавлении в образец микроколичеств соосадителя подобное превышение рекомендованного производителем количества можно получить из-за погрешностей пипетки. Кроме того, эти соосадители могут изначально присутствовать в наборах для выделения РНК некоторых производителей. Исследования показали, что оба метода анализа с использованием A_{260} и флуоресценции дают сравнимые результаты, когда концентрация РНК превышает 100 нг/мкл.

Для оценки чистоты и качества нуклеиновых кислот при спектрофотометрическом измерении, чистоту образца определяют, исходя из соотношения оптических плотностей при длинах волн 230, 260 и 280 нм.

Нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения при длине волны 260 нм, большинство белков – при 280 нм. Поглощение на длине волны 230 нм характерно для органических соединений и хаотропных солей, например, изотиоцианата гуанидина, который очень часто используют для выделения РНК.

Соотношение A_{260}/A_{280} для чистых нуклеиновых кислот должно лежать в пределах 1,8-2,2 и оптимально составляет ~1,8 и ~2,0 для ДНК и РНК, соответственно. Значение менее 1,8 может указывать на загрязнение образца полипептидами, более 2 – на возможную деградацию и наличии свободных нуклеотидов².

В настоящее время на рынке представлены спектрофотометры, позволяющие проводить измерение микроколичеств нуклеиновых кислот. Например, спектрофотометр NanoDrop 2000c от Thermo Fisher Scientific Inc. позволяет точное измерение концентраций РНК от 5 нг/мкл и ДНК - от 2 нг/мкл, в объеме от 1 мкл до 2 мкл³.

Для повышения чувствительности измерений используют также флуориметры и флуоресцентные красители с увеличением флуоресценции, наблюдаемой при связи с нуклеиновыми кислотами. Можно использовать как универсальные красители, например, такие как RiboGreen (Life Technologies)⁴, так и наборы реагентов, разработанные для использования с конкретной моделью флуориметра. По заявлению производителя, Thermo Fisher Scientific Inc., флуориметр Qubit™ 3.0 в сочетании с соответствующим набором реагентов позволяет точное измерение концентраций РНК от 250 пг/мкл, и концентраций ДНК - от 10 пг/мкл, в объеме от 1 мкл до 20 мкл⁵, а флуориметр NanoDrop 3300 - точное измерение концентраций РНК от 5 пг/мкл и ДНК - от 1 пг/мкл, в объеме от 1 мкл до 2 мкл.

Несмотря на то, что анализ A_{260} становится менее надежным при более низких концентрациях РНК⁶, следует помнить, что методы с использованием флуоресцентных красителей, как правило, требуют калибровочной кривой, и что количество используемого калибратора также необходимо оценивать (обычно посредством измерения A_{260}).

Помимо высокой чувствительности вторым важным преимуществом флуориметрического определения концентрации биологических молекул является его избирательность – на рынке представлено множество красителей и наборов реагентов, позволяющих отдельно анализировать концентрацию РНК и ДНК в одном и том же образце, что невозможно осуществить с помощью обычных спектрофотометрических методов анализа⁵.

При оценки количества нуклеиновой кислоты нужно принимать во внимание наличие в полученном образце всевозможного рода примесей. Помимо оценки количества примесей, необходимо также оценивать степень деградации нуклеиновых кислот. Спектрофотометрические способы оценки соотношения оптических плотностей при длинах волн 230, 260 и 280 нм оценивают количество примесей, но не позволяют оценить степень деградации нуклеиновых кислот. Эту проблему пытаются решить разработчики красителей для флуоресцентного анализа, например, в документации к красителю RiboGreen указано, что он не детектирует контаминацию образца свободными нуклеотидами, и таким образом, RiboGreen предпочтительнее использовать для образцов, где РНК деградирована в меньшей степени, чем для образцов, где РНК деградирована в значительной степени⁷.

Широкое распространение получили способы оценки качества РНК, основанные в первую очередь на определении рибосомальных РНК (рРНК)⁶.

Целостность РНК можно оценивать с использованием электрофореза в агарозном геле. Картина, обычно наблюдаемая в геле, представляет собой две полосы, содержащие молекулы рРНК 28S и 18S, и другие полосы, где локализованы более мелкие молекулы РНК. Качество РНК считают высоким, когда соотношение полос 28S:18S составляет приблизительно 2,0 и выше. Исходно этот способ основан на визуальной интерпретации изображений гелей и являлся исключительно субъективным. Позднее на основе электрофоретического разделения РНК в микрокапиллярах разработаны алгоритмы автономного и автоматизированного способа стандартизации качества РНК. Например, с помощью биоанализатора Agilent от Agilent Technologies определяют индекс целостности РНК (**RIN**). RIN лежит в пределах от 10 (неповрежденная РНК) до 1 (абсолютно деградированная РНК). Считают, что РНК, имеющая $RIN \geq 6$, соответствует РНК высокого качества и пригодна для дальнейшей работы. Подобным образом, с помощью других систем определяют аналогичные показатели: **RQI** (показатель качества РНК) для Experion от Bio-Rad Laboratories, **RIS** (показатель целостности РНК) для QIAxcel Advanced System от QIAGEN⁸ и **RINe** (эквивалент показателя целостности РНК) для ScreenTape от Agilent Technologies⁹.

Однако следует отметить, что рРНК со сходными показателями целостности РНК, полученными с помощью этих инструментов, могут содержать мРНК, сильно отличающиеся по целостности¹⁰, так что хорошее качество рРНК не обязательно является показателем хорошего качества мРНК.

В некоторых случаях невозможно количественно оценить этот параметр, например, когда доступно минимальное количество РНК из тканей после микродиссекции¹¹. Иногда сложно выделить РНК с соотношением 28S и 18S 2:1 из богатых РНК тканями и тканей некоторых опухолей. Некоторые авторы считают, что это требование избыточно, и препараты РНК с меньшим соотношением 28S и 18S могут являться вполне адекватными для большинства способов определения экспрессии генов. Как показано в одном из исследований, уровень конкретной РНК можно надежно

определять посредством ПЦР после обратной транскрипции, даже в тотальной РНК, обычно рассматриваемой как деградированная (с соотношением 28S к 18S настолько низким, как 0,4), при условии использования праймеров, синтезированных в случайном порядке (random-праймеров). В отличие от этого, использование олиго(дТ) праймера для обратной транскрипции может приводить к заниженному определению уровня специфической мРНК в образцах деградированной РНК, в зависимости от расстояния амплифицируемого фрагмента от поли(А)-конца¹².

Дополнительным недостатком использования молекул 18S или 28S рРНК в качестве стандартов является их отсутствие в очищенных образцах мРНК¹³.

Целостность ДНК также можно оценивать с использованием электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием бромидом этидия. Высокомолекулярная геномная ДНК обычно выглядит в геле как четкая полоса, расположенная очень высоко, недалеко от места нанесения на дорожку. Примеси РНК и деградированной ДНК выглядят как шмер, расположенный ниже. Более точно оценивать качество и количество ДНК можно, например, с помощью биоанализатора Agilent и набора реагентов Agilent High Sensitivity DNA Kit¹⁴ или с помощью биоанализатора Experion и наборов реагентов Experion™ DNA 1K Analysis Kit и DNA 12K Analysis Kit¹⁵.

Способы оценки количества и качества нуклеиновых кислот с использованием ПЦР

На основе Alu-повторов и подобных элементов, которые широко распространены в геноме, недавно разработаны системы для нормализации количества и оценки степени деградации ДНК, в первую очередь, ДНК человека. Подобные системы чаще всего используют для судебно-медицинской экспертизы. Так, например, в Applied Biosystems разработаны наборы реагентов для использования в сочетании с общепринятой технологией TaqMan® для анализа ПЦР с детекцией в реальном времени Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit¹⁶, Quantifiler® HP DNA Quantification Kit и Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit¹⁷. Данные наборы позволяют оценить уровень деградации ДНК посредством сравнения эффективности амплификации относительно коротких (~80 п.о.) и более длинных (>200 п.о.) ампликонов. Использование синтетической мишени в качестве внутреннего положительного контроля обеспечивает дополнительную оценку присутствия ингибиторов ПЦР в тестируемом образце. Аналогичные наборы реагентов, INNOQUANT® (для анализа тотальной ДНК) и INNOQUANT® HY (для анализа тотальной ДНК с учетом доли мужской ДНК), разработаны в InnoGenomics¹⁸.

Все упомянутые наборы обладают сходными характеристиками с точки зрения чувствительности (позволяют надежно анализировать пикограммовые количества ДНК), а также дизайна коротких, длинных ампликонов и внутреннего положительного контроля. Существуют также наборы для анализа заведомо деградированной ДНК, но они, как правило, предназначены для решения узких специальных задач¹⁹.

В PrimerDesign представлены наборы праймеров и реагентов для определения количества геномной ДНК в образце, специфические для различных видов животных (человека, мыши, крысы, свиньи, коровы, лошади, курицы). Праймеры детектируют однокопийную область нетранскрибируемой ДНК. Наборы предназначены в первую очередь для детекции примесей геномной ДНК хозяина в препаратах, полученных способами генной инженерии, но их можно использовать и для количественной оценки целевой ДНК в образцах, где она присутствует в малых количествах. Эта

система не позволяет оценивать степень деградации ДНК²⁰.

Недавно предложен способ использования экспрессированных Alu-повторов, расположенных в нетранслируемых областях мРНК, для определения общего количества мРНК. Более 1500 генов человека содержат один или несколько Alu-повторов в нетранслируемых областях. Таким образом, амплификация Alu-повторов может стать «универсальным» внутренним контролем на основании того, что дифференциальная экспрессия небольшого количества генов, несущих такие Alu-повторы, не будет оказывать большого влияния на представленность Alu-повторов в транскриптом²¹. Однако, необходима дальнейшая работа для оценки обоснованности предложенного метода¹¹. Например, из-за широкого распространения Alu-повторов в геноме, можно ожидать, что даже незначительные примеси геномной ДНК в препаратах РНК могут оказывать большое влияние на результаты амплификации.

Нормализация количественной оценки нуклеиновых кислот

Нормализация является необходимым компонентом точного количественного анализа нуклеиновых кислот. Ее целью является избегание технических ошибок посредством контроля количества и качества исходного материала, эффективности ферментов и различий общей транскрипционной активности в клетках и тканях.

Современные способы нормализации включают в себя:

- стандартизацию массы ткани,
- объема ткани,
- количества клеток,
- концентрации нуклеиновой кислоты,
- использование внутреннего и внешнего контроля.

В контролируемых условиях воспроизводимого выделения нуклеиновой кислоты хорошего качества, количество транскриптов гена идеально было бы стандартизовать на количество клеток, однако, точный подсчет клеток часто невозможен, особенно при использовании в качестве исходного материала солидной ткани или частично деградированных образцов, а также при малом количестве исходного материала. Нормализация по массе и объему ткани может допускать значительную изменчивость между образцами из-за возможной неравномерной структуры биологической ткани или циклов замораживания – размораживания. Нормализация по количеству нуклеиновых кислот также может являться источником ошибок из-за недостаточного количества и качества нуклеиновой кислоты, как обсуждали выше.

На сегодняшний день, внутренний контроль наиболее часто используют для нормализации фракции мРНК. Этот внутренний контроль, часто обозначаемый как гены домашнего хозяйства, составляют гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Транскрипты этих генов анализируют в тех же образцах, что и представляющие интерес транскрипты, таким образом, их экспрессия подвержена влиянию одних и тех же факторов – исходного количества материала, деградации нуклеиновых кислот, присутствия ингибирующих ферменты примесей, эффективности способов выделения и очистки, эффективности обратной транскрипции и, в определенной степени, эффективности ПЦР. Экспрессию представляющих интерес транскриптов, как правило, выражают в относительных единицах, с учетом уровня экспрессии генов домашнего хозяйства.

Внутренний контроль иногда дополняют внешним контролем. В качестве внешнего контроля обычно используют генетический материал, соответствующий по

последовательности представляющей интерес нуклеиновой кислоте. В самом простом случае, получают (например, синтетически) фрагмент ДНК, полностью совпадающий с ожидаемым продуктом ПЦР, и используют его для построения калибровочной кривой и определения абсолютного количества представляющего интерес транскрипта. Таким образом можно также оценивать эффективность ПЦР для конкретных последовательностей матрицы и праймеров. Для оценки влияния ингибиторов ПЦР анализируют амплификацию такого контроля в реакционной смеси, содержащей такое же количество исходного материала, что и анализируемые образцы. Обычно это соответствующие разведения реакционной смеси для обратной транскрипции без добавления обратной транскриптазы. Однако, описаны методики добавления внешнего контроля непосредственно в анализируемую реакционную смесь для получения суммарного количества транскриптов, из которого затем вычитают количество транскриптов для положительного контроля. Иногда разрабатывают внешний положительный контроль, который амплифицируется с тех же праймеров, но немного отличается от целевого продукта по длине и составу, для удобства анализа. Иногда в качестве внешнего положительного контроля используют заведомо положительные по представляющей интерес последовательности клетки, ткани или РНК, Их добавляют на разных стадиях обработки анализируемых образцов, чтобы оценить эффективность выделения и очистки (м)РНК, обратной транскрипции и ПЦР. В любом случае, следует учитывать, что введение в систему внешнего положительного контроля увеличивает риск контаминации и получения ложноположительных результатов, поэтому необходимо наличие соответствующего отрицательного контроля на всех стадиях и принятие мер против контаминации.

Очень важным является выбор генов домашнего хозяйства для внутреннего контроля конкретного эксперимента. Как уже сказано, экспрессия выбранного гена домашнего хозяйства не должна меняться в исследуемых тканях или клетках, или в ответ на исследуемую экспериментальную обработку. Увеличивается количество опубликованных доказательств того, что традиционно выбираемые контрольные гены демонстрируют изменчивую экспрессию в случае различных тканей и клеток (см. таблицу 2). Параллельно с этим продолжаются попытки обнаружения новых универсальных контрольных генов. В идеале, нормализацию следует проводить против множества контрольных генов, пригодность которых подтверждена экспериментально для конкретных тканей или типов клеток с учетом специфики эксперимента¹¹.

На практике, однако, чаще всего рассматривают около двадцати возможных контрольных генов для анализа транскриптома человека, и сходные количества – для анализа других организмов. Праймеры для анализа этих генов можно подбирать с использованием многочисленных доступных алгоритмов для подбора праймеров, в том числе праймеров, перекрывающих границу двух экзонов, а можно воспользоваться последовательностями праймеров, опубликованными в литературе. В некоторых фирмах доступны также готовые наборы праймеров для подбора оптимального контрольного гена и программное обеспечение для анализа результатов (см. ниже и в таблице 2).

Таблица 2. Примеры часто используемых генов домашнего хозяйства

Обозначение гена	Название кодируемого продукта	Функция кодируемого продукта	Локализация	Псевдогены	Примеры опубликованного изменения экспрессии мРНК		Коммерческие наборы праймеров	
					Повышение	Понижение		
ACTB	бета-актин	структурный белок цитоскелета	7p15-p12	+	под действием гормонов щитовидной железы ²³ , в опухолях желудка ²⁴ , при гепатоклеточной карциноме ²⁶ , при алкогольном гепатите ³²	при стеатозе печени ³²	gN	T
GAPDH	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	оксидоредуктаза в гликолизе и глюконеогенезе	12p13	+	под действием инсулина, EGF ²⁴ при раке легкого, поджелудочной железы, толстой кишки ²⁴ , гепатоклеточной карциноме ²⁶ , в условиях гипоксии ²⁵ , при алкогольном гепатите и фиброзе ³²	при стеатозе печени ³²	gN	T
UBC	убиквитин С	деградация белков	12q24	-	в скелетных мышцах ²⁹		gN	T
B2M	бета-2-микроглобулин	бета-цепь молекул главного комплекса гистосовместимости класса I	15q21-q22	-	при неходжкинской лимфоме ²⁴		gN	T
YWHAZ	зета-полипептид белка активации тирозин-3-монооксигеназы, триптофан-5-монооксигеназы	передача сигнала посредством связывания с фосфорилированным остатком серина на множестве сигнальных молекул	2p25	+			gN	T
18S rRNA	18S рРНК	18S рРНК малой субъединицы рибосомы	22p12	+			gN	T
RPL13A	рибосомальный белок 113а	структурный компонент большой субъединицы рибосомы	19q13	+			gN	
CYC1	белок цитохром С-1	перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий.	8q24	+	в тканях сердца ²⁸		gN	
EIF4A2	изоформа 2 эукариотического фактора инициации трансляции 4А	инициализация трансляции	3q28	-		при некоторых формах немелкоклеточного рака легкого ³³	gN	
SDHA	субъединица А комплекса сукцинатдегидрогеназы	перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий	5p15	+	в тканях сердца ³⁰		gN	

TOP1	ДНК-топоизомераза I	релаксация суперскрученной ДНК с внесением одноцепочечных разрывов	20q12-q13	+			gN	
ATP5B	синтаза АТФ	синтез АТФ в митохондриях	12q13	-	в тканях сердца ³¹		gN	
TUBB	бета-полипептид тубулина	структурный компонент микротрубочек	6p21	+				T
TBP	белок, связывающий ТАТА-бокс	фактор транскрипции РНК-полимеразы II	6q27	-	при гепатоклеточной карциноме ²⁶			T
RPLP	60S кислый рибосомальный белок P0	компонент большой субъединицы рибосомы	12	+				T
GUSB	бета-глюкуронидаза	деградация гликозаминогликанов	7q21	+				T
HPRT1	гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансфераза	синтез пуринов в пути утилизации отходов метаболизма	Xq26	+				T
PPIA	циклофилин А	фолдинг белков, хемотаксис, передача сигналов	7p13	+	в злокачественных опухолях различных локализаций ²⁷			T

gN - Human geNorm kit²²T - The Human Endogenous Control Panel от TATAA Biocenter²³

Можно начать подбор с выбора из этого списка тех генов домашнего хозяйства, для которых в литературе показана стабильная экспрессия в образцах, подобных тем, которые планируется анализировать. Предполагаемые гены-кандидаты должны обладать приблизительно таким же уровнем экспрессии, как и подлежащие исследованию гены. Если неизвестно, какой уровень экспрессии исследуемых генов ожидается в эксперименте, целесообразно выбрать по несколько генов домашнего хозяйства из групп с ожидаемым высоким и низким уровнем экспрессии. Если планируется использование тотальной РНК, следует обратить внимание на отсутствие псевдогенов и подбирать праймеры, перекрывающие границы экзонов и интронов, чтобы избегать амплификации с примесью геномной ДНК.

После конструирования собственных праймеров или закупки коммерческих наборов праймеров (например, от geNorm, TATAA Biocenter и т.п.) проводят оптимизацию условий ПЦР общепринятым образом, как описано во многих руководствах. Важно на этой стадии составить реакционные смеси, аналогичные тем, которые будут использованы в эксперименте, то есть использовать такие же объемы реакционных смесей, планшеты или пробирки, одно и то же оборудование для дозирования. Желательно использовать автоматические системы дозирования жидкостей, электронные пипетки и пипетки постоянного объема, чтобы уменьшить ошибки, связанные с неточностью отмеривания образцов и компонентов реакционных смесей. Необходимо определить перекрывающийся линейный диапазон измерений количества продуктов ПЦР как для мишени, так и для генов домашнего хозяйства. Все измерения необходимо проводить в экспоненциальной фазе ПЦР, в которой можно проследить отличия в скорости роста продукта. Различия в начальном количестве молекул влияют

на количество циклов, необходимых для подъема уровня флуоресценции выше уровня шума.

Исторически сложилось так, что это количество циклов производители разных систем для ПЦР с детекцией в реальном времени называют по-разному: пороговый цикл (quantification cycle, C_q, или threshold cycle, C_t), точка пересечения (crossing point, C_p) и точка отрыва (take-off point, TOF).

Способы определения этого значения несколько отличаются в разных системах, однако, в общепринятом в настоящее время руководстве по публикации экспериментов количественной ПЦР с детекцией в реальном времени³⁴ предложена его стандартизация как C_q, quantification cycle (в русскоязычной литературе принят перевод «пороговый цикл»).

Обычно проводят 40-50 циклов ПЦР, чтобы накопление продуктов амплификации вышло на плато и больше не увеличивалось с увеличением количества циклов. Считается оптимальным, чтобы значения C_q составляли приблизительно 20-30 для всех исследуемых генов. Не рекомендуется работать с C_q более 40, подобные значения C_q для нескольких генов домашнего хозяйства указывают на недостаточное количество или качество РНК в исходном образце, или на слишком большое разведение. Поскольку возможно также наличие ингибирующих полимеразу примесей, происходящих из исходного материала или внесенных на стадиях очистки РНК или синтеза кДНК, слишком высокие C_q могут указывать и на недостаточное разведение образца.

Для проверки эффективности ПЦР необходимо включать в эксперимент отрицательный контроль и желательно также включать в эксперимент положительный контроль. В качестве отрицательного контроля используют реакцию смеси без матрицы, чтобы убедиться в отсутствии контаминации, а также контроль, где в качестве матрицы используют реакцию смеси для синтеза кДНК, прошедшую все стадии инкубации, инактивации, разведения и т.п., но без добавления фермента для обратной транскрипции. Этот контроль позволяет оценить возможную амплификацию с примесей геномной ДНК в препарате РНК. Следует отметить, что возможны разные оценки того, что считать «отсутствием амплификации в отрицательном контроле». В идеале, после 40-50 циклов амплификации C_q для отрицательного контроля превышает количество циклов (для упрощения вычислений его обычно приравнивают к последнему циклу). Желательно на стадии подбора условий оценивать количество и чистоту продуктов амплификации электрофорезом в агарозном геле. В идеале, продуктов амплификации для отрицательного контроля в таком геле не выявляют. На практике, нижний предел C_q для отрицательного контроля обычно предустановлен в настройках амплификатора, можно считать отрицательными образцы, соответствующие этому значению, даже если на последующих циклах появляются продукты амплификации, и они видны в агарозном геле.

Обычно C_q для отрицательного контроля в настройках амплификатора при необходимости можно изменять, главное, чтобы это значение не было близким к C_q для анализируемых генов. И наоборот, не рекомендуется оценивать экспрессию анализируемых генов при C_q, близких к C_q для отрицательного контроля. В отношении положительного контроля эффективности амплификации возможны несколько вариантов. Во-первых, если в экспериментальных образцах образуются продукты ПЦР с оптимальными C_q в линейном диапазоне, можно проверить их однородность с помощью кривой плавления продуктов ПЦР (как подробно описано в руководствах к амплификаторам). Можно также проверить соответствие продуктов ожидаемому размеру и отсутствие неспецифических продуктов электрофорезом в

агарозном геле.

Для анализа результатов используют бесплатные пакеты программного обеспечения, из которых наибольшее распространение получили Bestkeeper, geNorm и Normfinder, использующие немного отличающиеся стратегии для идентификации подходящих контрольных генов.

Bestkeeper является доступным в форме подготовленных файлов Excel³⁵ для введения экспериментальных данных (для генов-кандидатов на роль контрольных генов и/или исследуемых генов), Алгоритм рассчитывает геометрическое среднее для всего набора предоставленных данных, таким образом, получая гипотетический глобальный фактор нормализации, «bestkeeper»: принимая постулат, что с увеличением количества генов, естественная биологическая изменчивость экспрессии генов вносит все уменьшающийся вклад в общую изменчивость концентрации кДНК по сравнению с изменчивостью, вызванной манипуляциями с образцами. Таким образом, посредством попарных сравнений между данными экспрессии индивидуальных генов и этим фактором «bestkeeper» можно идентифицировать гены с наименьшей изменчивостью, т.е., лучше отражающие общий уровень кДНК и, соответственно, мРНК³⁶

geNorm (в первоначальном варианте) более не находится в свободном доступе, он интегрирован в пакет программного обеспечения qBase³⁷, однако, копия совместимого с office 2010 исходного макроса доступна на сайте³⁸. В алгоритме принимают, что очень сходные паттерны изменчивости, наблюдаемые для экспрессии генов, ассоциированных с неродственными клеточными процессами (таких как представленные в панелях генов geNormPlus), с большей вероятностью отражают изменчивость уровней РНК, чем изменчивость экспрессии генов. Используют попарные сравнения для ранжирования генов-кандидатов по суммарной индивидуальной изменчивости, затем несколько раз отбрасывают ген с наибольшей изменчивостью перед повторением анализа, таким образом, идентифицируя пару генов с наименьшей изменчивостью, и ранжированный список генов с увеличивающейся изменчивостью. В алгоритме geNorm реализована возможность определения оптимального количества контрольных генов для конкретного эксперимента посредством улучшения определенного параметра при добавлении каждого следующего гена из ранжированных в предыдущем анализе, начиная с двух самых лучших³⁶.

Normfinder является доступным в форме дополнительного модуля для Excel или кода для R³⁹. Normfinder не осуществляет прямое попарное сравнение генов, а определяет индивидуальную изменчивость экспрессии каждого гена в данных условиях эксперимента, рассчитывая как изменчивость экспрессии между экспериментальными точками (например, временными точками), так и изменчивость для повторов измерений внутри одной экспериментальной точки, выбирая контрольный ген с наилучшей суммарной стабильностью. Помимо индивидуального наилучшего гена-кандидата, алгоритм может выбирать также наилучшую пару контрольных генов (предпочтение отдается лучшим генам с отклонениями экспрессии в противоположные стороны, поэтому в наилучшую пару генов-кандидатов может не войти индивидуальный наилучший ген-кандидат)³⁶.

Рекомендуют использование как минимум 2-3 контрольных генов¹¹. Если планируется большая серия однотипных экспериментов, можно рассмотреть порядка 10 генов и

выбрать из них несколько лучших после анализа экспериментальных данных с использованием одного или нескольких принятых в настоящее время алгоритмов (например, описанных выше Bestkeeper, geNorm, Normfinder). Можно воспользоваться коммерческими наборами праймеров, например, для 6 или 12 генов (от geNorm, TATAA Biocenter и т.п.). Как уже сказано, в алгоритме geNorm реализована возможность определения оптимального количества контрольных генов. Если нет возможности предварительных или параллельных обширных экспериментов, можно выбрать 3-4 гена, чтобы при необходимости отбросить один-два из них по результатам экспериментальной проверки. Более того, разработчики алгоритма geNorm считают, что в большинстве случаев просто использование 3 любых контрольных генов домашнего хозяйства является допустимой стратегией нормализации и приводит к намного более точной и надежной нормализации по сравнению с использованием одного непроверенного контрольного гена. Тем не менее, при анализе уникальных образцов с непредсказуемым уровнем экспрессии (например, клинических образцов), представляется целесообразным каждый раз проводить анализ полной панели генов домашнего хозяйства из выбранного коммерческого набора и возможно, отбрасывать образцы с отсутствием экспрессии хотя бы одного из генов домашнего хозяйства. Это может обеспечить необходимый уровень надежности и воспроизводимости полученных результатов²⁴.

Общие рекомендации

При выделении нуклеиновых кислот для последующего анализа необходимо определить необходимый баланс между выделяемым количеством нуклеиновой кислоты и количеством загрязнений. На современном рынке представлено множество наборов для выделения нуклеиновых кислот различной степени чистоты из различных биологических образцов. В большинстве случаев они позволяют получение препаратов нуклеиновых кислот, в достаточной мере свободных от белков, органических растворителей, парафина, детергентов и т.п.. Сложнее освободить представляющую интерес нуклеиновую кислоту от других нуклеиновых кислот. И хотя на рынке представлены средства для очистки, например РНК до уровня мРНК, следует рассматривать вопрос о целесообразности такой очистки для каждой конкретной задачи. Необходимо учитывать, что каждая дополнительная стадия очистки приводит к дополнительной затрате времени и средств, а также к потере вместе с примесями довольно значительной части целевого материала, что может являться неприемлемым в случае малого количества исходного образца. Увеличение количества стадий очистки уменьшает надежность нормализации по массе или объему исходного образца, поскольку эффективность этих стадий может несколько отличаться между отдельными экспериментами. Например, при анализе большого количества небольших объемов клинических образцов, возможно, будет затруднительно или нецелесообразно с точки зрения потери материала и стоимости эксперимента, проводить несколько стадий очистки РНК или ДНК. В подобных случаях можно рекомендовать совместное выделение РНК и ДНК с последующей специфической оценкой концентрации и степени деградации интересующей нуклеиновой кислоты. Как упомянуто выше, современные способы с использованием флуоресцентных красителей позволяют проводить оценку пикограммовых количеств РНК и ДНК. Обратная ситуация возникает при анализе нуклеиновых кислот из культур клеток, когда исходное количество клеток легко определить, и материала выделенных нуклеиновых кислот обычно бывает достаточно для дополнительной очистки.

При анализе экспрессии генов необходимо проводить нормализацию с

использованием тщательно выбранного набора контрольных генов. Для большинства экспериментов по анализу экспрессии генов с помощью ПЦР после обратной транскрипции, как правило, подходит препарат тотальной РНК или тотальных нуклеиновых кислот. При этом рекомендуется подбирать праймеры для ПЦР так чтобы прямой и обратный праймер обладали участками связывающиеся в различных экзонах, и желательно, чтобы участок связывания хотя бы одного из праймеров перекрывал границу двух экзонов. В последнем случае образование специфического продукта ПЦР возможно только с матрицы кДНК, но не с геномной ДНК. Следует отдельно отметить случай, когда необходимо провести анализ экспрессии РНК трансгена, интегрированного в хромосому хозяина. Трансген чаще всего не содержит интронов, и подобрать праймеры, позволяющие специфическую для РНК амплификацию, не представляется возможным. В этом случае необходимо предпринимать дополнительные меры для того, чтобы избавиться от примесей геномной ДНК – проводить обработку ДНКазой, возможно, дополнительную очистку до мРНК. На каждой из этих стадий теряется ощутимое количество материала, что затрудняет нормализацию по количеству клеток, но обычно материала бывает достаточно для нормализации по количеству РНК, даже с менее чувствительной спектрофотометрической и электрофоретической оценкой.

Оценку качества и количества полученного материала с использованием нормализации по генам домашнего хозяйства можно считать наиболее достоверным методом.

Можно рекомендовать по возможности дополнять нормализацию по продуктам амплификации ПЦР другими методами для всесторонней оценки получаемых результатов, такими как спектрофотометрический или флуориметрический.

Если у Вас есть вопросы или Вы нуждаетесь в консультации:

телефон: +7 495 737 4224

+7 495 998 4288

эл. почта: info@sileks.com