

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОИНФОРМАЦИОННЫХ МЕТОДОВ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ПРАЙМЕРОВ КОНСТИТУТИВНОГО ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ТУБУЛИН ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОТ-ПЦР

Адиева А.А.<sup>1</sup>, Израилова Г.Р.<sup>2</sup>, Халилов Р.А.<sup>2</sup>, Меджидова М.Г.<sup>1</sup>, Умарова Ю.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГАОУ ВО «Дагестанский государственный университет народного хозяйства», Махачкала, e-mail: adieva-m@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала

---

Исследования в области физиологии животных в настоящее время не ограничиваются уровнем целого организма. Методов биохимии, биофизики и тем более морфологии недостаточно для интерпретации явлений и механизмов, а именно, их молекулярных основ, происходящих в животной клетке. Молекулярные методы стали неотъемлемой и составной частью при изучении биологии растений и животных. В основе таких исследований лежит метод ПЦР и его модификация ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции, характеризующийся высокой чувствительностью и позволяющий оценить экспрессию генов на уровне мРНК. Начальным этапом этой трудоемкой методики является подбор праймеров к определенному гену, необходим опыт работы с информационными базами данных, нуклеотидными последовательностями и знание основ методики подбора праймеров. В работе приведена дорожная карта для успешного подбора праймеров исследователем при проведении молекулярных исследований в отсутствие на биотехнологическом рынке сертифицированных тест-систем и наборов, которая требует изучения биоинформационных программ наряду с глубоким анализом современных источников литературы.

Ключевые слова: дизайн праймеров, мРНК, циклины, ПЦР.

## THE USE OF BIOINFORMATIC METHODS IN THE DESIGN OF PRIMERS OT-PCR CONSTITUTIVE GENE ENCODING THE PROTEIN TUBULIN

Adieva A.A.<sup>1</sup>, Izrailova G.R.<sup>2</sup>, Khalilov R.A.<sup>2</sup>, Medjidova M.G.<sup>1</sup>, Umarova Y.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dagestan State University of national economy, Makhachkala, e-mail: adieva-m@mail.ru;

<sup>2</sup>Dagestan State University, Makhachkala

---

Methods of biochemistry, biophysics and especially morphology is not enough to interpret a number of phenomena and mechanisms that occur in an animal cell, for this reason research in the field of animal physiology is not limited to the level of the whole organism. Molecular methods have become an integral part in studying the biology of plants and animals. The basis of such research is the method of PCR and its modification RT-PCR – polymerase chain reaction after reverse transcription, characterized by high sensitivity and is used to evaluate gene expression at the mRNA level. The initial stage of this laborious technique is the selection of primers to a specific gene, required experience working with information databases, nucleotide sequences and knowledge of the basics methods of selection primers. For the successful matching of the primers by the researcher in conducting molecular studies in the absence of the biotechnological market of certified test systems and sets the road map presents in these article, which requires the study of bioinformatic programs along with a deep analysis of contemporary literature.

Keywords: disain primers, mRNA level, cyclin, PCR.

В настоящее время во многих лабораториях ведутся интенсивные исследования физиологических и биохимических процессов, которые происходят в организме животных во время зимней спячки. Однако многие вопросы остаются пока неясными. Так, например, неизвестно, какие молекулярные механизмы лежат в основе клеточной пролиферации при гибернации и гипотермии и насколько они отличаются друг от друга. Насколько активно идет синтез ДНК в межбавутном состоянии, способны ли входить клетки гибернирующих животных в митотический цикл и завершить его. Установление общности механизмов

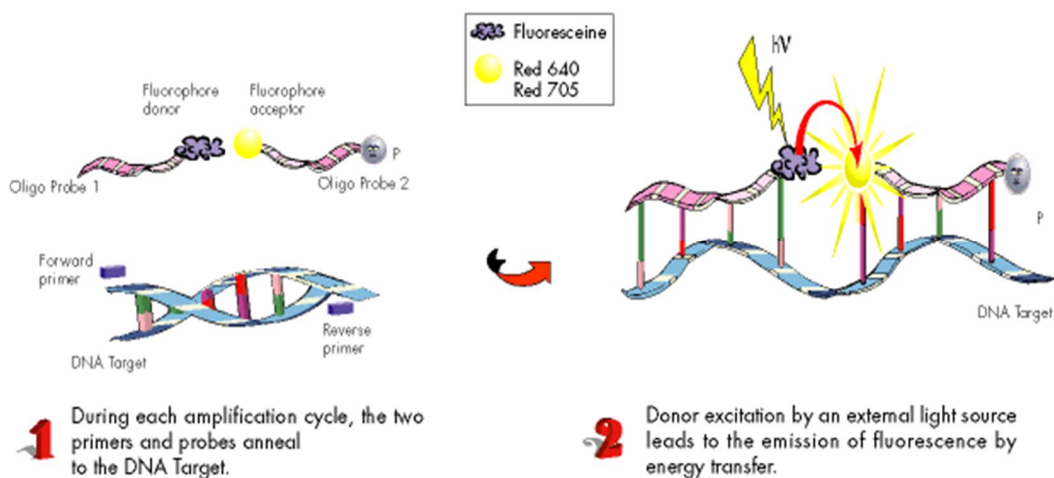
регуляции клеточной пролиферации у гомойотермных и гетеротермных животных может иметь большое значение в теоретической и практической медицине. Подтверждением этого может стать детальное изучение премитотического периода, где синтез РНК, а затем и белков продолжается, в частности синтез белка тубулина для микротрубочек веретена деления; центриоли достигают размеров дефинитивных органелл, и накапливается необходимое количество АТФ для последующего митоза [2]. Продолжительность клеточного цикла зависит от вида клетки, возраста животного, нейрогуморального статуса и других факторов. Также в различных тканях отличается и скорость деления клеток, которая зависит не только от длительности каждого периода, но и от прохождения критических точек цикла – точек рестрикции [7]. Кроме того, клеточный цикл контролируется специфическими регуляторами – комплексами циклинов и циклинзависимых киназ [1]. Исследования в области физиологии животных в настоящее время не ограничиваются уровнем целого организма. Методов биохимии, биофизики и тем более морфологии недостаточно для интерпретации явлений и механизмов, а именно, их молекулярных основ, происходящих в животной клетке. Молекулярные методы стали неотъемлемой и составной частью при изучении биологии растений и животных. В основе таких исследований лежит метод ПЦР и его модификация ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции, характеризующийся высокой чувствительностью и позволяющий оценить экспрессию генов на уровне мРНК. Начальным этапом этой трудоемкой методики является подбор праймеров к определенному гену, необходим опыт работы с информационными базами данных, нуклеотидными последовательностями и знание основ методики подбора праймеров [8]. Необходимо иметь две пары праймеров – к целевому и контрольному гену, в качестве которых используются конститутивные гены, экспрессия которых является относительно постоянной вне зависимости от внешних условий, что позволяет оценить изменение экспрессии целевых генов [5,6].

Целью настоящей работы является конструирование праймеров и оптимизация параметров полимеразной цепной реакции для анализа экспрессии уровня мРНК методом ОТ-ПЦР в различных тканях при гипотермии у гомойотермных и гетеротермных животных.

#### **Методы исследования**

Поиск последовательностей генов, к которым необходимы были праймеры, проводили в биоинформационной базе данных NCBI [10], который является национальным центром биотехнологической информации, где представлены сведения о структуре генома живых организмов – нуклеотидные и аминокислотные последовательности. Доступ к данному интернет-ресурсу является бесплатным и неограниченным, что является, безусловно, положительным моментом [9]. В данной работе для подбора праймеров и

условий проведения ПЦР с ними использовали программу «*Oligoanalyse*». Условия проведения ПЦР оптимизировали на образцах тканей лабораторных крыс. Выделение ДНК проводили по модифицированной методике, предложенной Dellaportae et al. [8]. Реакцию проводили с помощью амплификатора Light Cycler.



*Рис. 1. Принцип Light Cycler*

Принцип данной методики заключается в использовании двух проб, меченных флюоресцентной меткой, где с одного флюорофора, на 3<sup>1</sup>конце первой пробы переносится энергия ко второму флюорофору, находящегося на 5<sup>1</sup>конце второй пробы, если расстояние между флюорофорами не превышает 3 нуклеотидов.

### **Результаты исследования**

Для того чтобы определить где и когда экспрессируются данные гены, используют ОТ-ПЦР, для оценки транскрипции их на уровне мРНК. Как известно, молекулы РНК нестабильны, поэтому работа с РНК сопряжена с риском получения ложноотрицательных результатов. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез с помощью ревертазы одноцепочечной молекулы ДНК, которая используется в качестве матрицы для последующей реакции. Чем больше ПЦР продуктов образовалось в результате реакции, тем, следовательно, больше мРНК изучаемого гена находилось в пробе [3,4,11]. Один из ключевых моментов в исследовании – это правильный подбор праймеров – коротких нуклеотидных последовательностей (18-22 п.о.), которые служат затравкой для синтеза копий фрагмента ДНК за счет наличия свободного 3<sup>1</sup> конца. Праймеров должно быть два – прямой и обратный, комплементарных противоположным концам разных цепей исследуемого нами участка ДНК [5,11]. После денатурации молекулы ДНК, фермент (ДНК-полимераза), используя праймер в качестве затравки, синтезирует дочернюю нить ДНК, присоединяя нуклеотиды к 3<sup>1</sup>концу комплементарно матричной цепи. В данной работе

приведена последовательность действий при подборе праймеров для генов, кодирующих белок тубулин у крыс, где кодирование тубулина имеет олигогенный характер. Поэтому подбор осуществляли таким образом, чтобы праймеры подходили к нескольким генам, кодирующим разные цепи данного белка (альфа- и бета-) у представителей крыс. Для начала в базе NCBI – nucleotide находили мРНК целевых генов, на приведенном рисунке –  $\beta$ -6 цепи тубулина крыс (рис. 2). После необходимо определить кодирующие последовательности (рис. 3), и именно их в дальнейшем использовали как матрицы для подбора праймеров.

14.10.2015 Rattus norvegicus mRNA for tubulin, complete cds - Nucleotide - NCBI

Nucleotide

Display Settings: GenBank

**Rattus norvegicus mRNA for tubulin, complete cds**

GenBank: AB015946.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS AB015946 1420 bp mRNA linear ROD 13-AUG-1999  
 DEFINITION Rattus norvegicus mRNA for tubulin, complete cds.  
 ACCESSION AB015946  
 VERSION AB015946.1 GI:4115723  
 KEYWORDS tubulin.  
 SOURCE Rattus norvegicus (Norway rat)  
 ORGANISM [Rattus norvegicus](#)  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;  
 Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.

REFERENCE 1  
 AUTHORS Nakadai,T., Okada,N., Makino,Y. and Tamura,T.  
 TITLE Structure of rat gamma-tubulin and its binding to HP33  
 JOURNAL DNA Res. 6 (3), 207-209 (1999)  
 PUBMED [10470852](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1420)  
 AUTHORS Tamura,T.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (02-JUL-1998) Taka-aki Tamura, Chiba University,  
 Department of Biology, Faculty of Science; Yayoi-cho 1-33,  
 Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan  
 (E-mail:btamura@nature.s.chiba-u.ac.jp, Tel:81-43-290-2823,  
 Fax:81-43-290-2824)

FEATURES Location/Qualifiers

CDS [Feature](#) 1 of 1 AB015946 : 1 segment [Details](#) Display: [FASTA](#) [GenBank](#) [Help](#)

file:///C:/Users/%D0%AF/Desktop/Rattus%20norvegicus%20mRNA%20for%20tubulin,%20complete%20cds%20-%20Nucleotide%20-%20NCBI.html

Рис. 1. Интерфейс поискового окна

14.10.2015 Rattus norvegicus mRNA for tubulin, complete cds - Nucleotide - NCBI

[CDS](#)

```

/db_xref="taxon:10116"
19..1374
/codon_start=1
/product="tubulin"
/protein_id="BAA36504.1"
/db_xref="GI:4115724"
/translation="MPREIITLQLGQCGNQIGFEFWKQLCAEHGISPEGIVEEFATEG
TDRKDVFFYQADDEHYIPRAVLLDLEPRVIHSLNLSYAKLYNPENIYLSSEHGGGAGN
NWAASGFSQGEKJHEDIIFDIIIDREADGSDSLIEGFVLCHSIAGGTGSGGLGSLLERLNDR
YFKKLVQTYSVFPNQDEMSDVVQPYNSLLTLKRLTQNAQCVVLDNTALNLIATDRL
HIQNPSFSQINQLVSTIMSASTTTLRYPGYMNNDLIGLIASLIPTPRLHFIMTGYTPL
TDDQSVASVRKTIIVLDVMRRLLOPKNMVSTGRDRQTNHCYIAILLNIIQGEVDPQVH
KSLQRIIRERKLANFIPWGPASIQVALSRKSPYLPYSAHRVSGLMNMANHTSISLIFERTC
RQFDKLRKREAFMEQFRKEDIFKDNFDEMDTSSREIVQQLIDEVHAATRDPDYSWGTQE
Q"

```

ORIGIN

```

1 ccggaattcg ccattggcgat gccgagagaa atcatcacc tacagttgse ccagtgccbc
61 aatcagattg egttcgaatt ctggaacaag ctatgtgctg agcatggcat cagcccggc
121 gcagacgatg aggatttcgc caccgagggc actgaccgca aggacgtctt ttctaccag
181 gcagacgatg agcattacat cccccgggct gtgctgctgg acctggagcc cggggtgatc
241 catccatcc tcaactctc ctatgccaag ctctacaacc cagagaacct ctacctgtcc
301 ggcgatggag ggggggctgg caacaactgg gccaggggat tctcccaggg agaaaaaatc
361 cagaggaca ttttgacat cattgatcgg gaggacgatg scagtgacag ctagaggga
421 ttgtactgt gtcaactcct tcttgggggg acaggctctg gcttgggctc ctacctctg
481 gaacggctaa atgacagta cccccaaaaa ctagtgcaga cgtactcgtt gttccccaa
541 cagagcagga tgggtgacgt ggtgggtcag ccctacaact cctcctcac gttaaagg
601 ctgacccaga agcgggactg tgggtgggtg ctggacaaca cggccctgaa cctgatgcc
661 acagaccgcc tgcacatcca gaaccatcc ttctcccaga tcaaccagct ggtgtccacc
721 atcatgtcag ccagcaccac caccctgcgc taccgggat acatgaacaa cgacctatc
781 ggcctcatgc cctcactcat tcccaccct cgactaac tctcctgac tggctatcc
841 cccctcacca cggaccagtc agtggccagt gtgaggaaga caacagtcct ggatgcatg
901 aggagactgc tacagcccaa gaacgtgatg gtgtccacag gtcgggatcg ccagaccaac
961 cactgctaca tcgcatcct caacatcctc cagggagagg tggaccacc caggtccac
1021 agggcctgac agggatccc gggagggaag ttgctcact ttatccctg gggccggc
1081 agcatccagg tggccctgtc gaggagatct ccatacctgc cctcagccca cggggtgagc
1141 gggctccatg tggccaacca caccagtatc tctctgcttt ttgaaaggac cgtctgccag
1201 ttgacaagc tggggaacc ggaacccttc atggagcagt tccgcaaggga ggacatcttc
1261 agggcaatt tggcgggat ggaacatccc agggagatg tgcagcagc gattgagga
1321 tacatgccc ccacagggc agactacatc tcttggggc cccaggagca atgagtgcc
1381 cgagacaggg accctcatct gccttaccgg ttagccatgg

```

file:///C:/Users/%D0%AF/Desktop/Rattus%20norvegicus%20mRNA%20for%20tubulin,%20complete%20cds%20-%20Nucleotide%20-%20NCBI.html

Рис. 2. Кодирующая последовательность целевого гена

В программе «*OligoAnalyzer 3.1*» создали новую молекулу (File → Createnewsequence → Usingsequenceeditor DNA/RNA) (рис. 4).

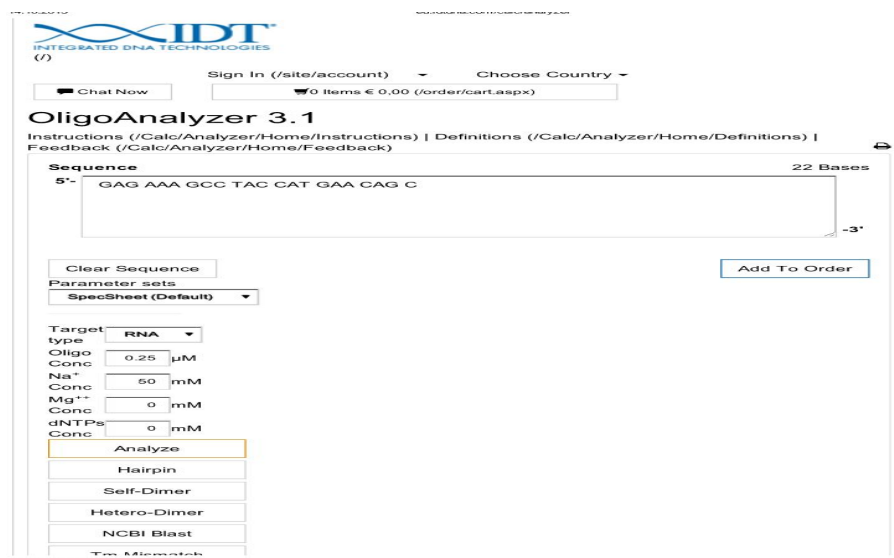


Рис. 3. Конструирование молекулы в программе «*OligoAnalyzer 3.1*»

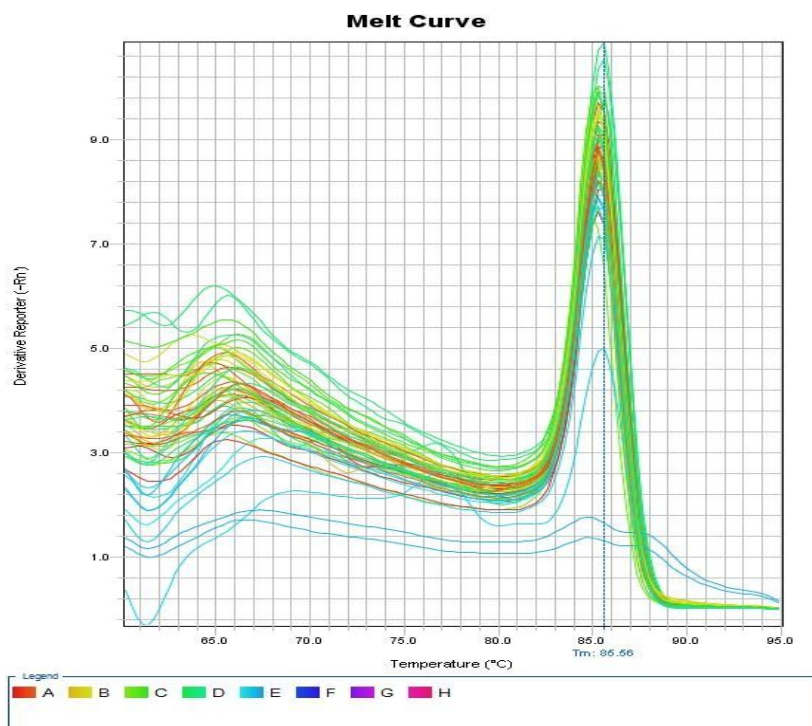
После чего была выделена последовательность, для которой необходимо подобрать праймеры и приступить к их моделированию (Primerdesign → Find PCR primers insideselection). В появляющемся диалоговом окне можно задавать необходимые условия – температура отжига (рекомендуется от 56 до 68 °C), длина праймеров (не длиннее 18–25 нуклеотидов), длина продукта (желательно выбирать в диапазоне от 200 до 600 нуклеотидов), качественное и количественное соотношение нуклеотидов, разница температур плавления (не более 2 °C) и другие параметры. В этой же программе можно определить температуру отжига, шпильки, гомо- и гетеродимеры, с помощью стандартных настроек, которые при желании можно подкорректировать. Необходимо учесть, что на конце должен находиться аденин или тимин, и нежелательно наличие повторяющихся подряд нуклеотидов – четырех C, G или трех A или T. Результатом поиска программы будет список предлагаемых продуктов, которые располагаются в порядке уменьшения их рейтинга, который вычисляется автоматически и отражает соответствие заданным параметрам. Нижняя допустимая граница – 140, в случае если рейтинг ниже 140 – категорически нельзя использовать праймер. Самый высокий рейтинг – 171.

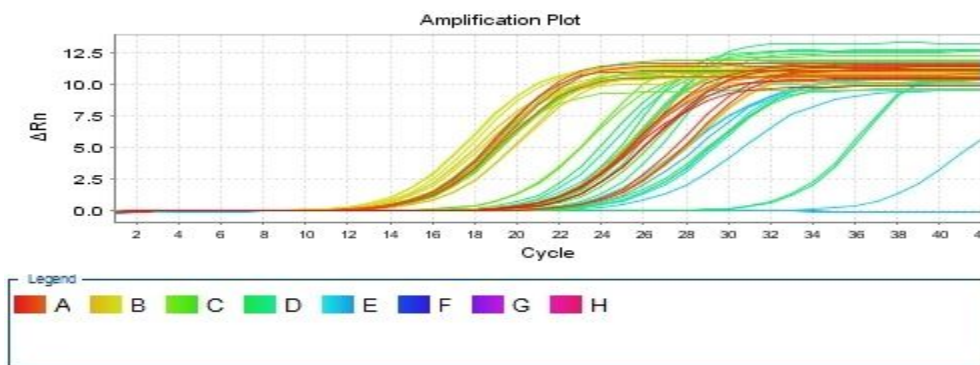
Выбор высокорейтинговой позиции не является заключительным этапом. Подходящую пару праймеров необходимо проверить на возможность образования шпилек, димеров (Analyses Thermodynamicproperties-Dimersandloops) и дуплексов (Analyses-

Oligoduplexes), где основным критерием отбора является величина энергии Гиббса (dG), при этом эта величина должна быть выше нуля. Проверка и отбор праймеров по этому критерию добавит работу исследователю, но значительно снизит вероятность получения некорректных результатов при проведении ПЦР. Для этого необходимо добавить оба праймера в список олигонуклеотидов, щелкнув правой кнопкой мыши и включив его в список (Addselectionooligolist). В данной работе, пошагово используя биоинформационный ресурс, была выбрана и синтезирована следующая последовательность праймеров к участку гена, кодирующего белок тубулин у крыс.

|                  |                                     |                                   |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Tbp</i>       | 5'-AGGAGCCAAGAGTGAAGAAC-3'          | 5'-CTC TAA CTT TAG CAC CTG TTA-3' |
| <i>EEF1a1</i>    | 5'-GCT CCA GTC AAT GTA ACA ACT-3'   | 5'-GGA TAA TCA CCT GAG CAG TGA-3' |
| <i>α-tubulin</i> | 5'-GAG AAA GCC TAC CAT GAA CAG C-3' | 5'-ATG CCA ACC TTG AAG CCA GTG-3' |
| <i>α-tubulin</i> | 5'-CTT TGA GCC AGC CAA CCA GAT-3'   | 5'-TGC CAA CCT TGA AGC CAG TG-3'  |

На втором этапе проводили тотальное выделение РНК из тканей печени и сердца крысы. Синтезировали кДНК, далее при оптимизированных условиях была проведена ПЦР и проверены сконструированные праймеры (рис. 5).





*Рис.5*

В данной работе приведенная последовательность действий при подборе праймеров не является универсальной или эталонной и основана на личном опыте авторов. Дорожная карта, приведенная в статье, вполне приемлема для успешного подбора праймеров исследователем при проведении молекулярных исследований в отсутствие на биотехнологическом рынке сертифицированных тест-систем и наборов. Однако для оптимизации работы и расширения знаний необходимо изучать биоинформационные программы и интернет-ресурсы, помимо глубокого анализа современных источников литературы.

### Список литературы

1. Адиева А.А., Меджидова М.Г. Использование новых молекулярно-биологических методов в диагностике вирусных инфекций // Известия ДГПУ. – 2010. – Т. 2 (11). – С.33-36.
2. Израилова Г.Р., Халилов Р.А., Адиева А.А. Современные подходы к исследованию гипотермии // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11-5. – С.1046-1058.
3. Кравцов А.К., Кузнецов В.В. Современные методы молекулярной биологии: Определение относительного содержания транскриптов генов с помощью ОТ-ПЦР. Кравцов А.К., Кузнецов В.В. Современные методы молекулярной биологии: Определение относительного содержания транскриптов генов с помощью ОТ-ПЦР. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – С.158–167.
4. Кофтун И.С., Ефимова М.В. Особенности подбора праймеров конститутивного гена для проведения полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции // Вестник ТГУ. Биология. – 2013. – № 2 (22). – С.160-171.
5. Лысенко Е. Современные методы молекулярной биологии – полимеразная цепная реакция. Стратегия подбора праймеров для анализа экспрессии генов. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – С.75-96.

6. Методы молекулярной и клеточной биологии в медицине. Адиева А.А., Меджидова М.Г., Магомедова П.Т., Израилова Г.Р. // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 12. – С.211-213.
7. Федорова Н.Е., Меджидова А.А., Меджидова М.Г., Куш А.А. Блок клеточной пролиферации и патология митоза в клетках, инфицированных цитомегаловирусом: роль периода клеточного цикла в момент заражения // ДАН. – 2003. – Т. 392 (№ 4). – С.552-555.
8. Dellaporta S., Wood J., Hicks J. A plant DNA miniprep: version II // Plant Molecular Biology Reporter. – 1983. – Vol.1(4). – P.19-21.
9. Gill P., Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. – 2008. – Mar; 27(3). – P.224-43.
10. GenBank Home. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>.
11. Lee Z.B., Firnhaber C., Clarke J., DeDecker B.S. Gene and library synthesis without amplification: polymerase step reaction (PSR) // Biotechniques – 2015. – Sep.1. – Vol. 59(3). – P.163-6.