

УДК 581.1

И.С. Ковтун, М.В. Ефимова

Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

ОСОБЕННОСТИ ПОДБОРА ПРАЙМЕРОВ КОНСТИТУТИВНОГО ГЕНА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПОСЛЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ
(12-04-90850-мол_рф_нр, 12-04-31500-мол_a).

При проведении исследований в области молекулярной биологии сложно обойтись без биоинформационного подхода. Биоинформатика является важным вспомогательным инструментом, умение использовать который значительно оптимизирует работу молодого ученого. Дано описание начальных этапов работы с базой данных NCBI и программой Vector NTI для самостоятельного поиска специфических последовательностей конститутивных и целевых генов и подбора праймеров к ним. Подобный объем работ у опытного исследователя не занимает много времени, однако для молодого ученого поиск последовательностей нуклеиновых кислот и праймеров может представлять значительную сложность. Данный этап работы является начальным при инициации молекулярно-биологических исследований. Ошибки и неопытность в работе могут привести к значительным временным и финансовым затратам. В представленной статье описывается пошаговый алгоритм действий, что может способствовать формированию общего представления о многофункциональности, значимости и масштабности использования биоинформационного подхода.

Ключевые слова: праймеры; конститутивный ген; тубулин; ПЦР; ОТ-ПЦР; Vector NTI; NCBI.

Введение

В настоящее время исследования в области физиологии растений не ограничиваются уровнем целого организма и клеток. Для проведения обстоятельного и многопланового исследования современная наука должна базироваться на методах молекулярной биологии. Биохимических, морфологических, биофизических и других методов становится недостаточно для описания и интерпретации ряда явлений и механизмов, происходящих в растительной клетке. Неотъемлемой составной частью многих молекулярных исследований является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Он основан на способности фермента ДНК-полимеразы осуществлять амплификацию определенного участка ДНК *in vitro* при условии введения в состав

реакционного буфера всех необходимых компонентов (праймеры, раствор нуклеотидов, проба ДНК или кДНК) [1]. ПЦР широко используется в биологической и медицинской практике. ПЦР лежит в основе многих методов исследований, в частности метода полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). ОТ-ПЦР характеризуется высокой чувствительностью и используется для относительной количественной оценки экспрессии генов на уровне мРНК.

Начальным этапом при подготовке постановки полимеразной цепной реакции является подбор праймеров к определенному гену, для успешной реализации которого необходим опыт работы с информационными базами данных, нуклеотидными последовательностями и владение основами методики подбора праймеров [2]. Наряду с подбором праймеров к целевым генам необходимо выбрать контрольный ген и праймеры к нему. В качестве контроля рекомендуется использовать ген или гены «домашнего хозяйства» (конститутивный ген), экспрессия которых является относительно постоянной вне зависимости от внешних условий, что позволит исследователю оценить изменение экспрессии целевых генов [3]. Несомненно, процедуру по подбору праймеров начинающий исследователь может доверить профессионалу или, еще проще, найти готовые последовательности в научной статье. Однако в последнем случае никто не может гарантировать достоверность и правильность опубликованных в статье последовательностей праймеров. Значительно упростить положение позволит освоение некоторых начальных подходов биоинформатики, не требующих финансовых вложений и особых навыков работы с компьютером.

В представленной статье рассматриваются основные принципы подбора праймеров для конститутивного гена, которые имеют ряд отличительных особенностей от методики выбора праймеров целевых генов.

Материалы и методики исследования

Для поиска последовательностей генов, к которым необходимо подобрать праймеры, удобно использовать биоинформационную базу данных NCBI. NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA) – национальный центр биотехнологической информации, в числе прочего предоставляет сведения о структуре генома живых организмов – о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Доступ к данному Интернет-ресурсу является неограниченным и бесплатным.

Для подбора праймеров и условий проведения ПЦР с ними использовали программу «Vector NTI 10». Для поиска праймеров для нескольких последовательностей генов использовали компонент программы «Vector NTI 10» – AlignX.

Оптимизировали условия проведения ПЦР на ДНК и кДНК из розеточных листьев трехнедельных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. По-

сле выделения РНК [4] с помощью обратной транскрипции получали кДНК. Выделение ДНК проводили по модифицированной методике Dellaporta et al. [5]. Реакцию ПЦР проводили с помощью амплификатора Eppendorf, Mastercycler personal (Германия).

Результаты исследования и обсуждение

Для исследования влияния определенного фактора на экспрессию генов в большинстве случаев оценивают их транскрипцию на уровне мРНК методом полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции. Известно, что молекулы РНК менее стабильны, чем молекулы ДНК, поэтому работа с РНК сопряжена с риском получения недостоверных результатов. Поэтому для исследования мРНК синтезируют ее ДНК-копии, которые могут быть использованы для проведения ПЦР. Чем больше ПЦР продуктов образовалось в результате реакции, тем больше мРНК исследуемого гена находилось в исходной пробе [6].

При проведении амплификации необходимо правильно подобрать праймеры – короткие нуклеотидные последовательности (18–22 п.о.), служащие затравкой для синтеза копий определенного фрагмента ДНК за счет наличия свободного 3'-конца [7]. Для постановки ПЦР необходимы 2 праймера – прямой (sense или forward) и обратный (antisense или reverse), – комплементарные противоположным концам разных цепей необходимого участка ДНК. После температурной денатурации молекулы ДНК фермент ДНК-полимераза, используя праймер в качестве затравки, синтезирует дочернюю нить ДНК, присоединяя нуклеотиды к 3'-концу комплементарно-матричной цепи.

Для наглядности представим последовательность действий при подборе праймеров для генов, кодирующих белок тубулин. Это гены домашнего хозяйства, продуктом которых является димер, состоящий из α - и β -цепей, отвечающих за построение микротрубочек [8]. Кодирование тубулина носит олигогенный характер. Поэтому подбор осуществляли таким образом, чтобы праймеры подходили к нескольким генам, кодирующим разные цепи данного белка, и для представителей семейства *Brassicaceae* – *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh и *Brassica napus* L.

В базе NCBI – nucleotide находили последовательности мРНК целевых генов (рис. 1).

Далее необходимо найти кодирующие последовательности (рис. 2) и именно их в дальнейшем использовать как матрицы для подбора праймеров.

Начнем с поиска праймеров для одной нуклеотидной последовательности. В программе «Vector NTI 10» необходимо создать новую молекулу (File → Create new sequence → Using sequence editor DNA/RNA) (рис. 3).

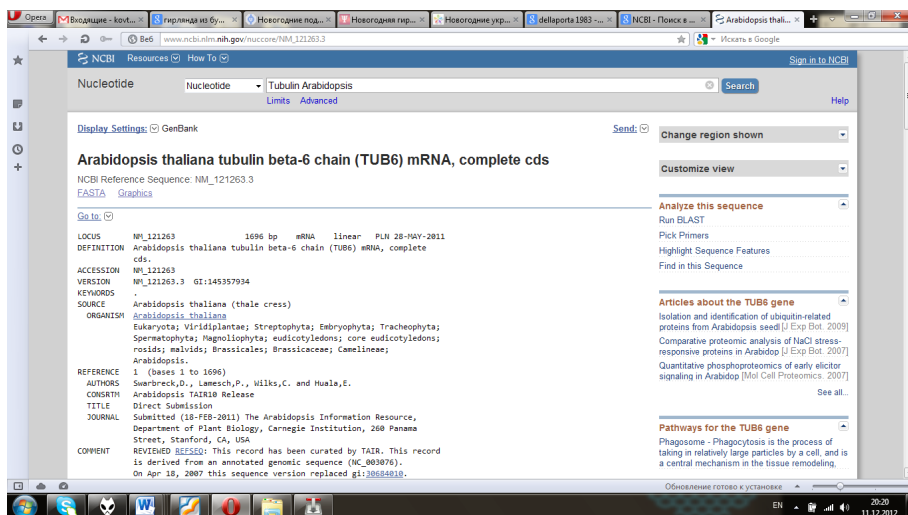


Рис. 1. Интерфейс поискового окна NCBI. Информация о матричной РНК β-6 цепи тубулина *A. thaliana*

AFLHWYTGEGMDEMEFTAEASNWINDLVSEYQQYQDATADDEGEYEDEDEEIILOH

ORIGIN

```

1 ttacctttcc ctcttcttac tctttcataa ataaatccaa ctttctcact ctcaccctgt
61 ctcacttctc ctctactcgc ggtcgacgat tatccaatc tcgccgggat tctcctctgc
121 accataaaat agaagatgag agaaatcctt cacattcaag gtggccaatg tgggaaccag
181 attggttcca agttctggga agttgatgt gatgagcatg gtattgatcc cactggatcc
241 tacgtttggaa actctgatct gcagtgggag cgtgtcaatg ttactataa cgaagcattc
301 tgcggaagat atgttccccg tgcaattctc atggatcttg agcctggtac tatggacagt
361 gtcagaactg gaccttatgg tcaaatcttc aggcctgaca actttgtttt cgggcaactc
421 ggtgctggaa acaactgggc taaagggcat tacactgaaq gagctgagct tattgatgtc
481 gttactgatg ttgtacgcaa agaggctgag aattgcgact gtcttcaagg ttccaagta
541 gttcactcac ttggtggagg caccgggtct ggaatgggaa ctctgctcat atctaagatc
601 aggggaagat atctgatag aatgatgctt acattttctg tcttccatc accaaagtc
661 tctgacacag tggttgagcc atacaatgag acactttcag ttcatacgt ggtgggaaat
721 gctgatgagt gtatgptttt ggacaatgaa gccctttacg acatctgttt tagaacactt
781 aagcttacca ctctagctt tggatgctg aatcatctta tctctgcaac catgagtgga
841 gttacatgct gttctagggt cccgggtcag ctcaactctg atctgaggaa gctcggatg
901 aacctcattc ttttccctcg tctccacttt tcatggttg gttttgccc tctcaactc
961 cgtgggtctc agcagtaccg tgcactcact gtcctgagc tgaccaaca gatgtgggat
1021 tcaaaagaac tgatgtgac agcagaccgc cgcaccgggc ggtactcaac tgcctcggcc
1081 atgttccgtg gcaagatgag cacaaaagaa gttgacgagc agatgataaa cgtacagaac
1141 aaaaactctt cctactttgt ggaatggatt ccaaaacagc tgaagtcaag cgtctgtgac
1201 atagctcccc gaggctctc aatggcatcg acatttattg ggaattccac atgatccaa
1261 agatgttta ggcgggtgag cgagcagttc actgctatg tcaggaggaa agctttcttg
1321 cattggtaca caggtgaagg aatggacgag atggagtta ctgaagctga gagcaacatg
1381 aacgatctag tctcagagta ccagcaatc caagacgcaa ctgcagatga cgaagcggag
1441 tatgaaagag acgagatga agaagagata ttgatcatg agtgagtgaa aagagctgat
1501 attaccgatt ttaaatacc tctcttatc tcttttcggt tggctggtat atgtttattg
1561 agtttcatgt atgttttggt atggctctgt tgtaaatagt aggtcggatc taaactttta
1621 tgcgtggttt ttaatgaaa ttgtccattg tggtttttta tgctcttct acttcaatta
1681 attggtttca caattt
    
```

Рис. 2. Кодированная последовательность целевого гена

Tubulin beta 6
1350 bp

Restriction sites: PstI (150), HindIII (647), XbaI (737), SmaI (799), SpeI (846), AclI (1074), EcoRI (1108), ClaI (1118), HindIII (1176), PstI (1294).

1	ATGAGAGAAA TCCTTCACAT TCAAGGTGGT CAATGTGGGA ACCAGATTGG TTCCAAGTTC TGGG
	TACTCTCTTT AGGAAGTGTA AGTTCACCA GTTACACCCT TGGTCTAACC AAGGTTC AAG ACCC
101	GTGCGTTACGT TGGAAACTCT GATCTGCAGT TGGAGCGGTG CAATGTTTAC TATAACGAGG CATC
	CAGCAATGCA ACCTTTGAGA CTAGACGTC ACCTCGCACA GTTACAATG ATATTGCTCC GTAG
201	TCTTGAGCCT GGTACTATGG ACAGTGTGAG AACTGGACCT TATGGTCAA TCTTCAGGCC TGAC
	AGAACTCGGA CCAATGATACC TGTCACAGTC TTGACCTGGA ATACCAGTTC AGAAGTCCGG ACTG
301	TGGGCTAAG GGCATTACAC TGAAGGAGCT GAGCTTATTG ATGCTGTACT CGATGTTGTA CGCA
	ACCCGATTTC CCGTAATGTG ACTTCCTCGA CTCGAATAAC TACGACATGA GCTACAACAT GCGT
401	AAGTATGTCA CTCACTTGGT GGAGGCACCG GGTCTGGAAT GGGAACTCTG CTCATATCTA AGAT
	TTCATAACAGT GAGTGAACCA CCTCCGTGGC CCAGACCTTA CCTTGAGAC GAGTATAGAT TCTA
501	TTCTGTCTTC CCATCACCAA AGGTCTCTGA CACAGTGGTT GAGCCATACA ATGCGACACT TTCA
	AAGACAGAAG GGTAGTGGTT TCCAGAGACT GTGTCACCAA CTCGGTATGT TACGCTGTGA AAGT
601	GTTTTGGACA ATGAAGCCCT TTACGACATC TGTTT TAGAA CACTTAAAGCT TACCCTCTCT AGCT
	CAAAACCTGT TACTTCGGGA AATGCTGTAG ACAAATCTT GTGAATTCGA ATGGTGGAGGA TCGA

Рис. 3. Конструирование молекулы в программе «Vector NTI 10»

Далее выделить область в последовательности, для которой необходимо подобрать праймеры и приступить к их моделированию (Primer design → Find PCR primers inside selection). В результате появится диалоговое окно, где можно задавать необходимые условия поиска праймеров – температура отжига, длина продукта, длина праймеров, качественное и количественное соотношение нуклеотидов, разница температур плавления каждой пары [9] и другие показатели (рис. 4).

Длину продукта рекомендуется выбирать в диапазоне от 200 до 600 нуклеотидов, температуру отжига от 56 до 68°C, разница температур отжига до 2°C, длина праймеров от 18 до 25 нуклеотидов. В программе заложены стандартные настройки, которые исследователь может подкорректировать. Необходимо учитывать, что наличие повторяющихся подряд нуклеотидов (четырех G, C и трех A, T) нежелательно и на 3'-конце должен находиться аденин или тимин.

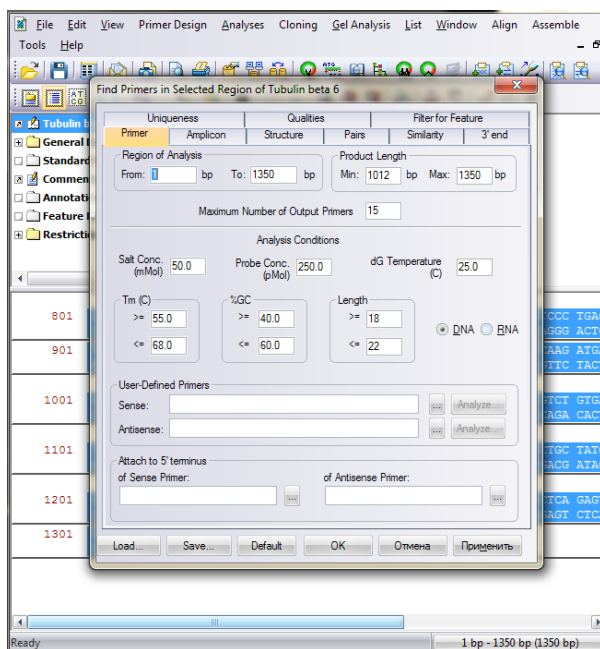


Рис. 4. Диалоговое окно программы «Vector NTI 10» для программирования условий поиска праймеров к целевому гену

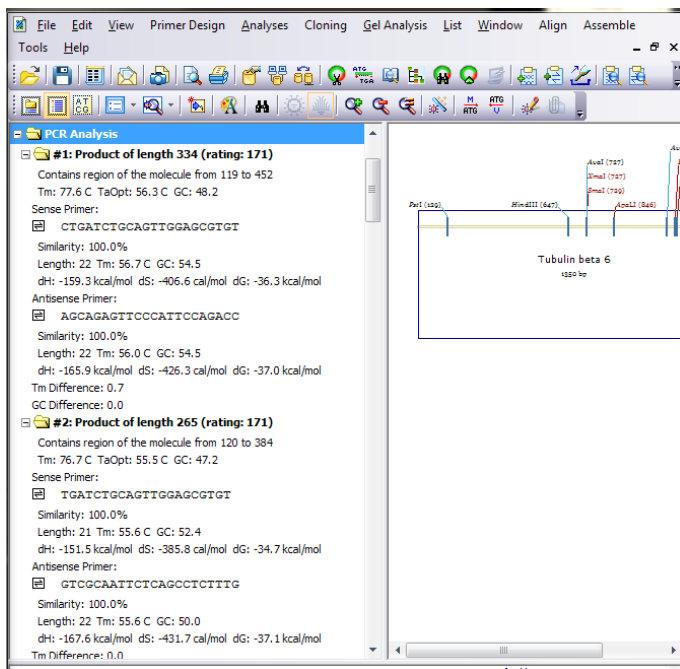


Рис. 5. Анализ продуктов, предложенных программой «Vector NTI 10»

Результатом поиска программы будет список предлагаемых продуктов, расположенных в порядке уменьшения их рейтинга (рис. 5). Рейтинг вычисляется автоматически и отражает соответствие задаваемым параметрам. Самый высокий рейтинг – 171, допустимая граница – 140. В случае если рейтинг ниже 140, то высока вероятность того, что праймеры использовать нельзя.

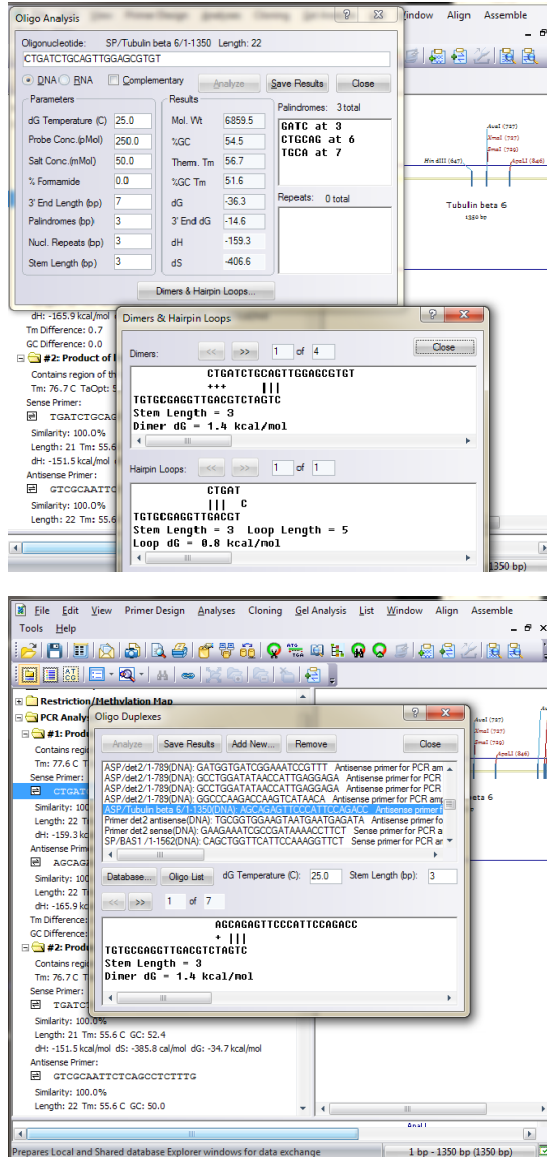


Рис. 6. Анализ термодинамических свойств праймеров в программе «Vector NTI 10»

После того, как будет выбрана подходящая пара праймеров, ее необходимо проверить на возможность образования шпилек, димеров (Analyses-Thermodynamic properties-Dimers and loops), дуплексов (Analyses-Oligo duplexes), предварительно добавив оба праймера в список олигонуклеотидов (правой кнопкой мыши щелкнуть по праймеру, затем включить его в список (Add selection to oligo list) (рис. 6).

Основным критерием отбора праймеров в данном случае является величина энергии Гиббса (dG), при этом dG не должна быть отрицательной. Проверка и отбор праймеров по этому критерию значительно снизит вероятность получения некорректных результатов при проведении ПЦР.

При работе с разными растительными объектами или, как в данном случае, с последовательностями, кодирующими разные цепи белка тубулина, появляется необходимость подбора праймеров для нескольких последовательностей сразу. При этом процедура подбора незначительно изменяется. Анализ проводится с помощью компонента программы «Vector NTI 10» – AlignX (Align-AlignX-Align selected molecules), куда необходимо скопировать исследуемые последовательности, присвоив им определённые имена (рис. 7).

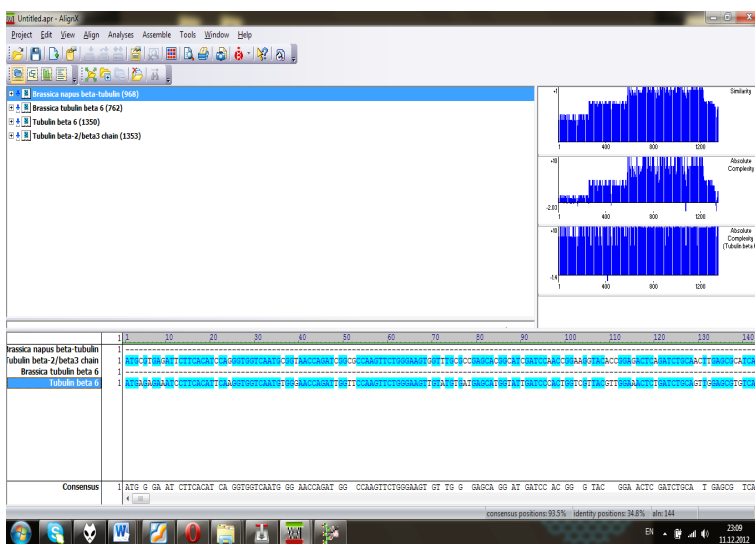


Рис. 7. Интерфейс AlignX

На следующем этапе необходимо выделить сравниваемые последовательности и на панели инструментов выбрать Align using profile. После проведения операции программа предложит выровненные последовательности, степень совпадения нуклеотидов в которых обозначается цветом (желтый – полное совпадение, голубой и зеленый – неполное и белым – отсутствие совпадений) (рис. 8).

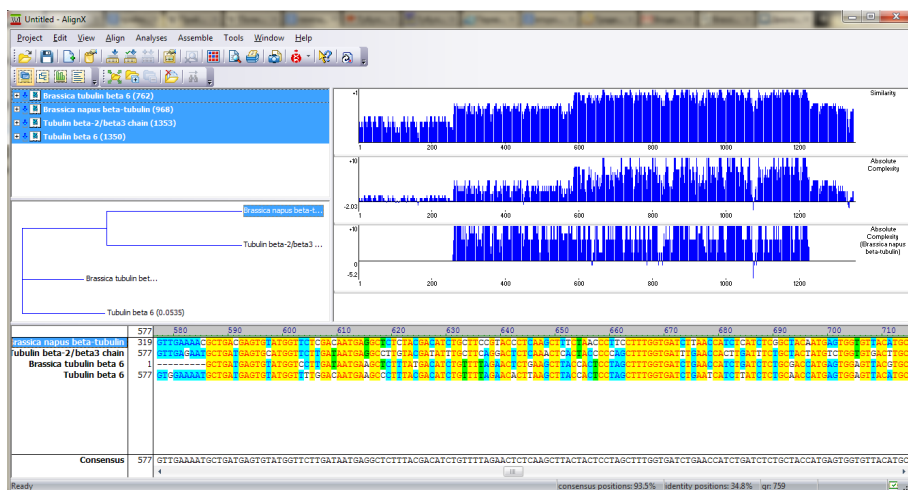


Рис. 8. Сравнение нуклеотидных последовательностей в окне AlignX

Далее нужно подбирать различные варианты праймеров так, чтобы их концы выпадали на участки, последовательность нуклеотидов в которых одинакова для всех анализируемых последовательностей. Желательно, чтобы и внутри последовательности праймера вариабельность была минимальной.

Чтобы праймеры подходили ко всем анализируемым последовательностям, можно сделать их вырожденными, для этого необходимо согласно табл. 1 заменить буквы в последовательности праймера.

Таблица 1

**Замена буквенных обозначений нуклеотидов
при подборе вырожденных праймеров**

Буквенное обозначение нуклеотида при замене	Буквенное обозначение нуклеотида	Буквенное обозначение комплементарной пары нуклеотида
A	A	Т в ДНК, U в РНК
C	C	G
G	G	C
T или U	Т в ДНК, U в РНК	A
M	A или C	K
R	A или G	Y
W	A или T	W
S	C или G	S
Y	C или T	R
K	G или T	M
V	A или C или G	B
H	A или C или T	D
D	A или G или T	N
B	C или G или T	V
X или N	A или C или G или T (U)	Любой

После проведения всех манипуляций мы остановились на четырех парах вырожденных праймеров для тубулина (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Подобранные пары праймеров для тубулина

Название гена		Праймеры	Длина продукта, п.о.
<i>Tubulin</i>	1	sense – CTTTGGTGATYTKAAAYCA antisense – TRAAYTCCATCTCGTCCAT	563
	2	sense – CTTTGGTGATYTKAAAYCA antisense – AGCYTTYCTCCTGAACAT	517
	3	sense – CTGTCTKMGKTTCCCKGGT antisense – TRAAYTCCATCTCGTCCAT	512
	4	sense – CTGTCTKMGKTTCCCKGGT antisense – AGCYTTYCTCCTGAACAT	466

Для анализа выбранных праймеров нужно использовать «Vector NTI 10» (Analyses-Thermodynamic properties). Температуру отжига можно определить в программе «Vector NTI 10» или подсчитать по формуле $4(G+C)+2(A+T)$, где G, T, A, C – буквенные обозначения нуклеотидов. При этом из-за вырожденности учитывали максимально и минимально возможную температуру отжига для каждой последовательности (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Условия проведения процедуры отжига праймеров

Название последовательностей	Температура отжига, °C		Название праймеров	Температура и время отжига для пары праймеров
	min	max		
Tubulin 1S	46	52	Tubulin 1	52°C, 15 с
Tubulin 1AS	52	56	Tubulin 2	50°C, 15 с
Tubulin 3S	56	64	Tubulin 3	57°C, 15 с
Tubulin 4AS	50	54	Tubulin 4	56°C, 15 с

Таким образом, нами был проведен теоретический анализ подбора праймеров и условий их функционирования для постановки ПЦР. После осуществления всех манипуляций необходимо на практике выявить наиболее удачную пару праймеров. Образцы кДНК растений очень сложно синтезировать, по этой причине условия проведения ПЦР отрабатывают на геномной ДНК. Проводится это путем постановки ряда ПЦР, подстраивая температуру, время отжига и синтеза в зависимости от длины праймеров и продукта реакции (рис. 9).

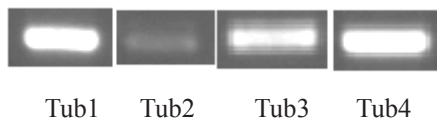


Рис. 9. Результаты электрофореза в агарозном геле для проверки качества подобранных праймеров для гена тубулина *Arabidopsis*

В результате анализа, судя по качеству получившихся продуктов, наиболее удачным будет использование праймеров Tubulin 1 или Tubulin 4. Их можно использовать в исследованиях кДНК. Однако не стоит забывать о том, что по качеству праймеров и длине продукта можно только предположить об амплификации участка кДНК или ДНК целевого гена, тогда как подтверждение этого можно получить только после секвенирования извлеченного из геля продукта и сравнения сиквенса с последовательностью гена в базе данных NCBI.

Заключение

Таким образом, описан пошаговый алгоритм действий при осуществлении работ по поиску нуклеотидных последовательностей генов и подбору праймеров к ним. Описание проводилось на конкретном примере с использованием последовательностей генов конститутивного белка тубулина для разных растительных объектов. Приведенная последовательность действий при подборе праймеров не является эталонной и основана на личном опыте авторов. Описанных базовых навыков вполне достаточно для успешного подбора праймеров начинающим исследователем, впервые столкнувшимся с необходимостью проведения молекулярных исследований. Однако для оптимизации работы и расширения знаний в этой области необходимо не только анализировать современные источники литературы, но и изучать появляющиеся Интернет-ресурсы и вспомогательные биоинформационные программы.

Литература

1. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. 1985. Vol. 230 (4732). P. 1350–1354.
2. Лысенко Е.А. Современные методы молекулярной биологии: Полимеразная цепная реакция. Стратегия подбора праймеров для анализа экспрессии генов. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. С. 75–96.
3. Классическая и молекулярная биология. URL : molbiol.ru
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М. : Мир, 1984. 479 с.
5. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: version II // Plant Molecular Biology Reporter. 1983. Vol. I (4). P. 19–21.

6. Кравцов А.К., Кузнецов В.В. Современные методы молекулярной биологии: Определение относительного содержания транскриптов генов растений с помощью ОТ-ПЦР. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. С. 158–167.
7. Kleppe K. Studies on polynucleotides. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases // *Molecular Biology*. 1971. Vol. 56. P. 341–361.
8. Williams R.C., Shah C., Sackett D. Separation of tubulin isoforms by isoelectric focusing in immobilized pH gradient gels // *Analytical Biochemistry*. 1991. Vol. 275 (2). P. 7–265.
9. Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Qian J., Wallace R.B. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction // *DNA Cell Biology*. 1991. Vol. 10. P. 233–238.

Поступила в редакцию 11.12.2012 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 2 (22). P. 160–171

Irina S. Kovtun, Marina V. Efimova

Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia

FEATURES OF PRIMER DESIGN FOR CONSTITUTIVE GENE IN REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION

Present-day science must base on molecular biology methods to conduct detailed and multifaceted researches. Biochemical, morphological, biophysical and other methods are not enough for description and interpretation of phenomena and mechanisms that occur in a plant cell. The polymerase chain reaction (PCR) is an integral part of many molecular investigations. The PCR is the basis of many research methods, in particular, of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). RT-PCR is characterized by high sensitivity and is used for relative quantitative assessment of gene expression on mRNA level. The initial phase while preparing to carry out the polymerase chain reaction is the primer design for specific gene. For successful realization of this process it is necessary to have some experience in work with information databases, nucleotide sequences and primer design. Also, it is necessary to find primers not only for specific genes but also for control gene. As a means of control, it is recommended to use the «housekeeping» gene or genes (constitutive gene), the expression of which is relatively constant regardless of external conditions. This fact will help to assess the change of expression of the target genes. This scope of work doesn't take a researcher a lot of time, but for a young explorer this search of nucleic acid sequences and primers can present a significant challenge. Wherewith, especially this phase of work is the initial stage of the initiation of molecular biological studies. All mistakes and inexperience could bring a great time and financial costs. In the present article a step-wise sequence of actions when searching for nucleotide sequences of genes and primer design to them are described, which may contribute to a general idea of the versatility, value and scope of bioinformatics approach. The description is made on a specific example using gene sequences of the constitutive protein tubulin of different plant objects. Described basic skills are quite enough for a young researcher to make a successful primer design, who has encountered the need for molecular studies for the first time.

Key words: primers; constitutive gene; tubulin; PCR; RT-PCR; Vector NTI; NCBI.

Received December 11, 2012