

## Детекция экспрессии эукариотических генов при помощи ПЦР-РВ, основанной на эффекте FRET, на платформе “УФА”

**Постригань Богдан Нилович**

аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: [postrigan@bk.ru](mailto:postrigan@bk.ru)

В настоящее время трудно представить, чтобы какое-либо из направлений физико-химической биологии не использовало методы амплификации специфических фрагментов ДНК или РНК для их наработки, либо высокочувствительной детекции.

Разработанные нами варианты ПЦР-РВ, (Чемерис А.В., 2005, С. 5) основанные на эффекте переноса флуоресцентной резонансной энергии (FRET) от донорного флуорофора к акцепторному, входящих в состав прямого и обратного праймеров, отжигающихся встык на платформе “УФА” (Универсальная Флуоресцентная Амплификация) могут найти применение для простой и удобной количественной оценки уровня экспрессии различных генов, содержащих интроны. Места отжига праймеров для интрон-содержащих генов должны подбираться по краям соседних экзонов с таким расчетом, что при амплификации молекул РНК это приведет к возникновению эффекта переноса энергии, а вклад геномной ДНК, где праймеры за счет интрона располагаются далеко друг от друга, будет, таким образом, отсутствовать, поскольку в этом случае перенос энергии не произойдет из-за заметно большего расстояния между красителем-донором и красителем-акцептором.

Работа по обнаружению транскрипционной активности генов фитохелатинсинтазы велась используя растения *Oryza sativa*. Был проведен анализ индукции гена различными концентрациями кадмия в проростках риса в реальном времени, используя перенос энергии между красителями FAM-ROX, для чего была выделена тотальная РНК из обработанных и контрольных растений, далее на ее основе поставлена РТ-ПЦР в режиме реального времени в ДНК амплификаторе с оптическим модулем iCycler iQ в одностадийном режиме, используя ST- полимеразу, при которой наблюдалось накопление флуоресцентного сигнала акцепторного красителя количественно. Размер ампликона составлял 130 п.н.

Также велась работа с *Triticum aestivum* по определению транскрипционной активности гена фитохелатинсинтазы. В данном случае не было необходимой информации по интронам этого гена, но и здесь благодаря сближенному расположению праймеров, образующих короткие ампликоны также с успехом может быть применен метод ПЦР-РВ на платформе “УФА”. Принципиальным моментом здесь является использование термостабильной Tth РНКазы H, которая в первом цикле должна разрушить исходную цепь РНК и сделать построенную на ней кДНК, пригодной для отжига второго праймера, минуя стадию высокотемпературной денатурации. В дальнейшем денатурация коротких ампликонов производится при минимально достаточной для этого температуре, полностью исключая тем самым вклад ДНК. В рамках этой части работы также была выделена тотальная РНК, но отличие в проведении реакции заключалось в том, что она велась при помощи Tth полимеразы в присутствии термостабильной РНКазы H, праймеры были сконструированы по такому же принципу, с переносом энергии в системе FAM-ROX и дальнейшей регистрацией FRET-эффекта в амплификаторе с оптическим модулем iCycler IQ.

### Литература

Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Романенкова М.Л., Матниязов Р.Т., Гималов Ф.Р., Малеев Г.В., Вахитов В.А. ПЦР, ЛЦР и ГЦР - цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2005. - Том 1, №2. - С. 5-14