

АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЧЕЛОВЕКА TIM-1 МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2019 г Т. Ю. Бондаренко*, В. А. Святченко, В. А. Терновой

*E-mail: lemtat@ngs.ru

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово,
Новосибирская область, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 29.03.2019

Уровень экспрессии гена человека Т-клеточного-иммуноглобулинового-муцинового домена (TIM-1) является диагностически значимым при различных патологических состояниях организма. Целью настоящей работы была разработка ПЦР-системы для анализа уровня экспрессии гена TIM-1 с детекцией в режиме реального времени. Проведен дизайн праймеров и флуоресцентного зонда на консервативные участки гена TIM-1. Фрагмент гена был клонирован в плазмиду, которая в дальнейшем использовалась в качестве положительного контроля. Оптимизацию условий ПЦР проводили с использованием в качестве модели культуры клеток НЕК293 (клетки почки эмбриона человека). Уровни экспрессии гена TIM-1 были определены в слюне десяти здоровых доноров, и они достоверно не отличались между собой. Разрабатываемая система может быть альтернативой закрытым коммерческим системам. В дальнейшем мы планируем проведение исследований экспрессии гена TIM-1 при различных патологиях.

Ключевые слова: рецептор, TIM-1, количественная ПЦР, ПЦР в реальном времени, иммунный ответ, экспрессия гена

DOI: 10.31857/S102872210006750-0

Адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, отдел молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, лаборатория молекулярной эпидемиологии ООИ. Бондаренко Т. Ю. Тел./факс: +7(383) 3634700, 2164.

E-mail: lemtat@ngs.ru

Авторы:

Бондаренко Т. А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии ООИ, отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Святченко В. А., к.б.н., зав. лабораторией вирусологии флавивирусов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Терновой В. А., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии ООИ, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство генов человека Т-клеточного-иммуноглобулинового-муцинового домена (5q33.2) один из участников регуляции иммунологического ответа и реакций на вирусные инфекции. Являющийся представителем этого семейства,

ген TIM-1 преимущественно экспрессируется клетками Т-хелперов 2 типа и функционирует в качестве костимулирующей молекулы для активации Т-клеток [1]. Впервые TIM-1 был открыт как рецептор вируса гепатита А [2]. Повышенный уровень экспрессии TIM-1 характерен при аутоиммунных нарушениях, повреждениях почек различного генеза и др. [3, 4]. Много работ проведено по поиску генетических полиморфизмов промоторного района и 4-го экзона TIM-1 при различных патологических состояниях у людей из разных географических районов [3]. Существуют ИФА тест-системы для выявления белка, кодируемого TIM-1. Однако повышению уровня белка предшествует повышение уровня экспрессии гена, и в связи с этим целью данной работы было создание системы для анализа уровня экспрессии гена человека TIM-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток НЕК293 (клетки почки эмбриона человека) была получена из банка кле-

точных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки отбирали на фазе логарифмического роста. Выделение тотальной РНК и синтез кДНК проводили согласно [5]. Были подобраны праймеры и флуоресцентный зонд на консервативные участки, комплементарные районам 3–4 экзона ТИМ-1. После обратной транскрипции проводили ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX-96.

Фрагмент гена ТИМ-1 был клонирован в плазмиду, которая в дальнейшем использовалась в качестве положительного контроля. Соотношение генома вставки к вектору было 0.09. Концентрация ДНК плазмиды измерялась на флуориметре QUBIT. Для построения стандартной калибровочной кривой были приготовлены последовательные 10-кратные разведения плазмиды. ПЦР-фрагменты и встройка в плазмиду были секвенированы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизацию условий ПЦР проводили на модели культуры клеток НЕК293. Выбранные нами праймеры были комплементарны разным экзонам, что позволяет использовать для анализа образцы с содержанием ДНК. В качестве мишеней были выбраны наиболее консервативные участки генома. Специфичность анализируемых районов генома была подтверждена секвенированием. Уровень экспрессии ТИМ-1 вычислялся с помощью стандартной кривой и на модели культуры клеток НЕК293 для лизата 10^5 клеток составил 3.6×10^{-18} М/мл.

В последнее время большие надежды возлагаются на неинвазивные методы взятия матери-

ала, и слюна является одним из них. В слюне десяти здоровых добровольцев уровни экспрессии гена ТИМ-1 достоверно не отличались между собой. В дальнейшем мы планируем проведение исследований экспрессии гена ТИМ-1 при различных патологиях.

Таким образом, нами была разработана и апробирована ПЦР-система для определения уровня экспрессии гена ТИМ-1 в режиме реального времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Freeman G. J., Casasnovas J. M., Umetsu D. T., De Kruyff R. H. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2010 May; 235(1):172–89.
2. Feigelstock D., Thompson P., Mattoov P., Zhang Y., Kaplan G. G. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol.* 1998 Aug; 72(8):6621–8.
3. Chae S. C., Song J. H., Lee Y. C., Kim J. W., Chung H. T. The association of the exon 4 variations of Tim-1 gene with allergic diseases in a Korean population. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 12; 312(2):346–50.
4. Moresco R. N., Bochi G. V., Stein C. S., De Carvalho J. A. M., Cembranel B. M., Bollick Y. S. Urinary kidney injury molecule-1 in renal disease. *Clin Chim Acta.* 2018 Dec; 487:15–21.
5. Bondarenko T. Y., Ternovoi V. A., Svyatchenko V. A., Kiselev N. N., Chausov E. V., Muntyanova M. U., Nemtsov Y. V., Yashin V. V., Kryuk N. I., Kuslii A. G., Nikulin L. G., Netesov S. V. Complete genomic sequence of rapidly replicating strain MB-7 of hepatitis a virus and its characterization in comparison with nucleotide sequence of other hepatitis a virus strain. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2010; 25: 39–46.

ANALYSIS OF LEVEL EXPRESSION OF THE HUMAN GENE TIM-1 USING REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

© 2019 T. Yu. Bondarenko*, V. A. Svyatchenko, V. A. Ternovoi

*E-mail: lemtat@ngs.ru

FBUN State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor,
Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 29.03.2019

The expression level of a human T-cell immunoglobulin-mucin domain (TIM-1) gene is diagnostically significant in human diseases. The purpose of this work was to develop a real-time PCR method for analysis the expression levels of the human TIM-1 gene. The design of primers and fluorescent probe on the conservative parts of the TIM-1 gene was carried out. The fragment of the TIM-1 gene was cloned into a plasmid and further it was used as a positive control. The optimization of the PCR conditions was performed using the HEK293 cell culture as a model. The expression levels of the TIM-1 gene were determined in the saliva of ten healthy volunteers and they did not differ significantly. The system being developed may be an alternative to closed commercial systems. We plan to use it in the research of different pathologies in the future.

Key words: receptor, TIM-1, quantitative PCR, real-time PCR, immune response, gene expression

Authors:

Bondarenko T. Yu., ✉ PhD, Researcher of Laboratory of Molecular Epidemiology EDI, FBUN State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. **E-mail:** lemtat@ngs.ru;

Svyatchenko V. A., PhD, Head of Laboratory of virology of flaviviruses, FBUN State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia;

Ternovoi V. A., PhD, Head of Laboratory of Molecular Epidemiology EDI, FBUN State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia.