

Выбор «хаускипинг-гена» для анализа уровня экспрессии генов методом количественной ОТ-ПЦР после криоконсервирования клеток

П.А. Борисов, А.Ю. Димитров, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Selection of Housekeeping Gene for Analysis of Gene Expression Level in Post-Thaw Cells Using Quantitative RT-PCR Method

P.A. Borisov, A.Yu. Dimitrov, A.N. Goltsev

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Криоконсервирование является эффективным способом долгосрочного хранения биообъектов, а также мультифакторным стрессом, который заключается в воздействии физических и химических факторов, обуславливающих, как следствие, множество изменений структурного и функционального характера в криоконсервированном материале. В результате этого может происходить модификация биообъекта, которая затрагивает не только метаболические процессы, но и самый низкий уровень их регуляции – геномный [B. Fuller, 2004]. Более того, различные режимы криоконсервирования могут по-разному влиять на работу генома одной и той же клетки.

На сегодня наиболее точным и чувствительным способом количественного определения изменений экспрессии генов является проведение обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Определение относительного уровня представленности транскриптов позволяет сравнить контрольный и опытный экспериментальные образцы. При этом проводится нормирование общего количества РНК в образцах, которое позволяет нивелировать различия в количестве и/или качестве стартового материала, а также в условиях пробоподготовки. Для этого используют транскрипты «хаускипинг-генов», имеющих относительно стабильный уровень экспрессии во всех типах клеток, а также, предположительно, не поддающихся влиянию экспериментальных воздействий [Д. Ребриков, 2009]. Однако согласно данным литературы не существует такого «хаускипинг-гена», уровень экспрессии которого был бы стабильным при различных экспериментальных условиях [E. Spanakis, 1993; R. Hanafy, 2011]. Пока не существует данных о влиянии криоконсервирования на экспрессию «хаускипинг-генов», что не исключает ее изменение после замораживания-оттаивания.

Поэтому при использовании конкретного референсного гена необходимо экспериментально подтвердить постоянство уровня его представленности в исследуемых образцах. Вариантом решения такой задачи является параллельное определение уровня представленности транскриптов и их стабильности для нескольких «хаускипинг-генов». В результате такого исследования можно будет объяснить выбор референсного гена, наиболее подходящего для конкретного исследования, в частности для определенного режима криоконсервирования.

Cryopreservation is an effective method for long-term storage of bioobjects, on another hand it causes a multifactor stress consisting in physical and chemical exposures resulting in stipulation of multiple structural and functional changes in cryopreserved specimens. Finally these may lead to the bioobject modification affecting metabolic processes as well as the basic level of their regulation, the genome [B. Fuller, 2004]. Moreover, different cryopreservation regimens may affect the functioning of genome of the same cell in a various way.

Nowadays the real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is the most accurate and sensitive method of estimation of gene expression changes. Assessment of relative transcript representation allows to compare control and experimental samples. Total RNA amount in the samples is usually normalized, that enables to balance the differences in quantity and/or quality of initial material and during sample preparing as well. The transcripts of housekeeping genes are used for this purpose, they possess relatively stable expression in all cell types, as well as are presumably non-sensitive to experiment conditions [D. Rebrikov, 2009]. However there is no reports on housekeeping gene, which expression level is stable in different experimental conditions [E. Spanakis, 1993; R. Hanafy, 2011]. Moreover, there is no data on how cryopreservation affect housekeeping genes expression, but the post-thaw changes could not be excluded.

Thus, using the particular reference gene requires the experimental evidence for stability of its representation level in the studied samples. Simultaneous assessment of transcript representation level and their stability for some housekeeping genes is likely to solve this task. Such a research will allow to explain the selection of reference gene, the most appropriate for certain investigation, in particular, for specific cryopreservation regimen.

