

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук**

**Методическое пособие к практикуму
«НОВЫЕ ГЕНОМНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СТАРЕНИЯ»**

Москва 2013

УДК 575.113;
ББК 28.04
П 831

Протасова М.С., Решетов Д.А. Методическое пособие к практикуму «Новые геномные подходы для идентификации генетических факторов старения».

ISBN

В книге изложены теоретические и практические аспекты исследования генетических факторов, связанных со старением. Подробно рассмотрены современные методы анализа генов. Приведена методика для идентификации молекулярно-генетических факторов старения, в том числе с использованием новейшего оборудования.

Издание будет полезным для преподавателей ВУЗов, студентов, аспирантов, стажеров научно-образовательных центров, а также для широкого круга специалистов, работающих в области генетических исследований.

Программа курса подготовлена с использованием материалов, полученных в рамках проекта «Новые геномные подходы для идентификации молекулярно-генетических факторов старения», финансируемого Министерством образования и науки по Программе "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" (Соглашение № 8053 от 20.07.2012 г.)

Протасова М.С., Решетов Д.А, Москва: Цифровичок. - 2013 г. – 42 с.

Научное издание
Протасова Мария Сергеевна, Решетов Денис Александрович
Новые геномные подходы для идентификации молекулярно-генетических факторов старения
(Отпечатано с готового оригинал-макета)

ISBN

© ИОГен РАН, 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	4
Полиморфные варианты генов, связанные со старением	4
Теломерные повторы в геноме человека, как маркеры старения.....	5
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	7
РАЗДЕЛ 1. Анализ полиморфизмов в генах, связанных со старением с помощью ПЦР	7
Задача 1. Выделение ДНК из Buccal-соскобов	7
Задача 2. Определение аллельного полиморфного варианта в хромосомном локусе человека методом ПЦР-ПДРФ, на примере локуса гена H1VER2.....	10
Задача 3. Определение аллельного полиморфизма гена APOE	14
Задача 4. Определение аллельного полиморфизма в хромосомном локусе человека, методом прямого секвенирования, на примере локуса гена ZACN....	17
РАЗДЕЛ 2. Анализ длины теломерных повторов в геноме человека	26
Задача 5. Определение длины теломерных повторов методом количественного анализа ПЦР в реальном времени.....	26
Задача 6. Оценка количества теломерных повторов в данных полногеномного секвенирования	32
ЛИТЕРАТУРА	34
ПРИЛОЖЕНИЕ	37

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Старение человека – это сложный процесс, затрагивающий все уровни его организации, поэтому генетика старения, а особенно идентификация и анализ генетических факторов старения актуальны в настоящее время.

Среди наиболее изученных генетических маркеров старения – длина теломерных повторов, а также однонуклеотидные вариации в генах потенциально связанных со старением.

1. Полиморфные варианты генов, связанных со старением

Мутации в кодирующих участках генов могут приводить к патологическим нарушениям или наоборот нести адаптивный эффект. В данном методическом пособии рассматриваются примеры генов, связанных со старением. Ген HIVEP2 кодирует один из членов семейства цинковые пальцы - содержащий транскрипционный фактор. Кодируемые белки участвуют в регуляции транскрипции различных клеточных и вирусных генов, которые могут быть вовлечены в процесс роста, развития, и метастаза. Мутации в этом гене приводят к изменениям экспрессии этих генов, и таким образом оказывают эффект на рост и развитие индивидуума. Ген ZACNB кодирует белок цинк-активируемый ионный канал, участвует в развитии центральной нервной системы. Ген APOE расположен на хромосоме 19 и кодирует аполипопротеин E – белок, играющий важную роль в метаболизме и транспорте липидов, в частности, в поддержании обмена холестерина. В гене APOE известны две транзиции С и Т, каждая из которых ведет к замене аргинина на цистеин в полипептидной цепи белка: в положении 112 и 158 полипептидной цепи. Этим полиморфным вариантам гена соответствуют три изоформы белка – E2 (Cys112, Cys158); E3 (Cys112, Arg158); E4 (Arg112, Arg158). Независимыми исследованиями подтверждено, что аллель APOEε4 гена APOE у больных с поздней формой БА встречается чаще, чем у людей пожилого возраста без признаков деменций, но в то же время отмечено, что в ряде этнических групп такая ассоциация слабо выражена или вовсе отсутствует.

2. Теломерные повторы в геноме человека, как маркеры старения.

Одним из потенциальных маркеров старения многие исследователи рассматривают длину теломерных повторов в лейкоцитах периферической крови. Теломеры представляют собой нуклеопротеиды, расположенные на концах хромосом и состоящие из многократно повторяющихся коротких последовательностей ДНК. При репликации молекулы ДНК отстающая цепь синтезируется прерывисто: на вторую нить садится РНК-праймер, с которого ДНК-полимераза начинает синтез фрагмента Оказаки – до следующего РНК-праймера, после чего застраивает место, оставшееся после «чужого» праймера. Таким образом, при репликации линейной ДНК после удаления затравки на 3'-конце хромосомы остается пустое место, которое невозможно достроить из-за отсутствия дальше нового фрагмента Оказаки. Теломерные повторы решают эту проблему, образуя длинный одноцепочечный «хвост» на отстающей цепи, который не несет в себе смысловой нагрузки, тем самым при репликации не теряются важные участки ДНК, а теряются только многочисленные теломерные повторы.

Теломеры человека состоят из гексамера TTAGGG. Считается, что в половых клетках человека средняя длина теломер составляет 9 т.п.н., тогда как в соматических клетках — около 4 т.п.н. (Harley *et al.*, 1990).

Долгое время после открытия теломер их функция была неясна. Позже согласно теории Оловникова (1971г.) было высказано предположение, что теломеры предотвращают утрату смысловых частей ДНК при репликации и что клеточное старение начинается при полной утрате теломерных повторов, в связи с чем, происходит частичное повреждение кодирующей части ДНК. При работе с культурами клеток человека было показано, что количество клеточных делений соматических клеток строго определено и зависит от возраста индивидуума, из которого был получен образец (от 80 до 20 делений в зависимости от возраста). Это число называется «лимитом Хейфлика». По достижении предела клетка теряет способность делиться и начинается процесс старения. Таким образом, считается, что укорочение теломер связано со

старением клеток и тканей, а длина теломерных повторов в лимфоцитах клеток крови может служить биологическим маркером старения человека.

Одним из методов оценки длины теломерных повторов в лимфоцитах крови является метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Впервые данный метод был описан в работе калифорнийской группы ученых в 1993 году (Higuchi et.al., 1993). Основное отличие метода ПЦР в реальном времени от классической полимеразной цепной реакции — наличие флуоресцентной метки и датчика, осуществляющего постоянную фиксацию уровня флуоресценции. Флуоресцентная метка может быть введена в реакцию тремя альтернативными способами — с помощью зонда, специфичного к интересующему исследователя участку, с помощью флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных праймеров или же с использованием интеркалирующего красителя.

РАЗДЕЛ 1. Анализ полиморфизмов в генах, связанных со старением с помощью ПЦР

Задача 1. Выделение ДНК из буккальных соскобов

Цель задачи заключается в выделении ДНК из буккальных соскобов и ее анализ с помощью электрофореза в агарозном геле.

Схема эксперимента:

Выделение геномной ДНК из биологического материала включает несколько этапов: первоначально проводят лизис клеток, затем обеспечивается депротеинизация клеточного лизата и далее проводят элюцию геномной ДНК.

Перед взятием буккальной пробы необходимо убедиться, что пациент не употреблял продуктов питания и питьевых напитков в течение 30 минут. Затем с помощью персональной щеточки провести забор эпителия соскобом клеток с внутренней стороны щеки. Соскоб проводить аккуратными, но тщательными движениями не менее 6 раз. Высушить соскоб на воздухе в течение 2 часов. Для выделения ДНК из буккальных соскобов существуют различные коммерческие наборы реагентов, позволяющие эффективно выделять геномную ДНК.

Выделение геномной ДНК

Выделение ДНК проводят в стерильных условиях, предотвращающих контаминацию реактивов и образцов. Перед началом работы все рабочие поверхности обрабатывают хлорными дезинфицирующими растворами, проводят УФ-облучение. Обязательно использование одноразовых перчаток для предотвращения контаминации с поверхности рук.

1. Выделение ДНК проводят строго по протоколу фирмы - производителя используемого набора реагентов для выделения ДНК.
2. Для растворения (или элюции) выделенной ДНК желательно использовать буфер, содержащий 10 мМ Tris-HCl и 0.5 мМ EDTA для увеличения стабильности ДНК и продолжительности срока хранения, также можно использовать воду высокой степени очистки (Milli Q).
3. Выделенную ДНК следует хранить при температуре -20°C, размораживание следует проводить на льду. Частые повторные размораживания приводят к повреждению геномной ДНК, поэтому их следует избегать.

Анализ выделенной ДНК в агарозном геле

Для визуальной оценки препаратов общей ДНК проводят электрофоретическое разделение полученных образцов ДНК в 1%-ном агарозном геле. Перед началом работы необходимо приготовить исходные растворы (общие для всех студентов):

1. Для приготовления 2%-ного агарозного геля добавить 2,5 г агарозы к 125 мл буфера TAE (1x)
2. Нагреть смесь в микроволновой печи при мощности 600W до полного растворения агарозы (примерно 2 мин).
3. Охладить раствор агарозы до 50-55°C и добавить бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.
4. Залить раствор в специальную камеру для заливки агарозных гелей и немедленно вставить гребенки для формирования лунок таким образом, чтобы между ее зубьями и дном оставался зазор 0,5-1 м.
5. Оставить гель до полного застывания при комнатной температуре (примерно 20-30 мин).
6. Аккуратно вынуть гребенку, не повреждая лунки, и поместить плашку с гелем в электрофоретическую камеру, заполненную буфером TAE (x1).

Проконтролировать, чтобы буфер полностью покрывал агарозный гель и заполнил его лунки.

Проведение электрофореза в 2%-ном агарозном геле

1. Отобрать из пробирки с препаратом выделенной ДНК 5 мкл и смешать их с 1 мкл раствора для нанесения проб на гель.
2. Внести пробы с раствором для нанесения в лунки геля.
3. В отдельную лунку внести маркер молекулярных размеров
4. Провести электрофорез при 5-10 В/см до тех пор, пока краситель не продвинется на 2-3 см.
5. Сфотографировать гель в коротковолновом УФ-свете.
6. Оценить размер полученных фрагментов ДНК и их примерное соотношение между собой в соответствии с рисунком 1.

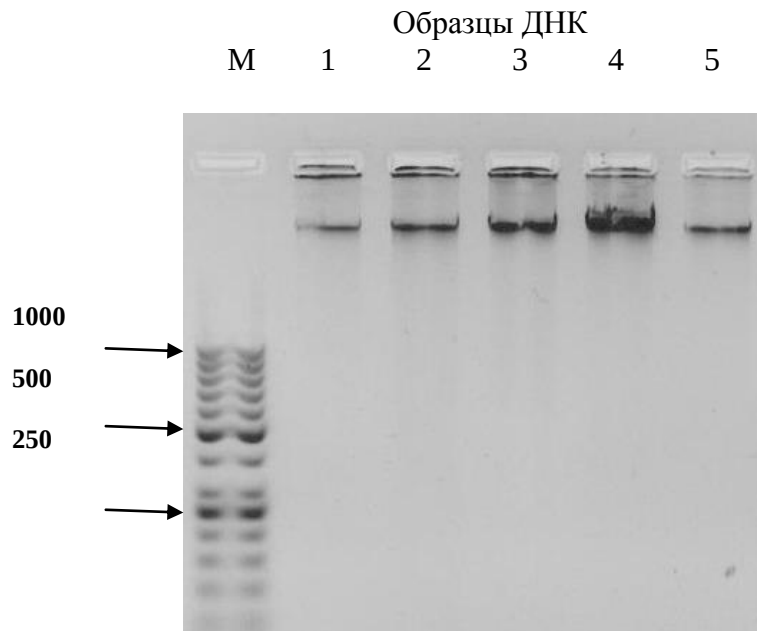


Рисунок 1.

Пример электрофореграммы тотальной ДНК, выделенной из образцов крови.

М - Маркер молекулярных весов «Fermentas»,
1-5 – образцы тотальной ДНК из крови.

Задача 2. Определение аллельного полиморфного варианта в хромосомном локусе человека методом ПЦР-ПДРФ, на примере локуса гена *HIVER2*

Цель задачи: определение генотипов образцов ДНК методом ПЦР-ПДРФ.

Определение аллельного полиморфизма, ведущего к аминокислотной замене Р685S в гене *HIVER2* проводят с помощью рестрикционного анализа ПЦР-продуктов этого гена. Для этого ПЦР-продукты, полученные с помощью праймеров, фланкирующих участок, содержащий полиморфный маркер, ведущего к аминокислотной замене Р685S в гене *HIVER2*, обрабатывают эндонуклеазой рестрикции и полученные фрагменты анализируют с помощью электрофореза в агарозном геле. Аллельные варианты полиморфного локуса определяют по наличию или отсутствию сайта рестрикции используемой эндонуклеазы. Рестрикционная карта амплифицируемого фрагмента и размеры продуктов рестрикции приведены на рис. 2.

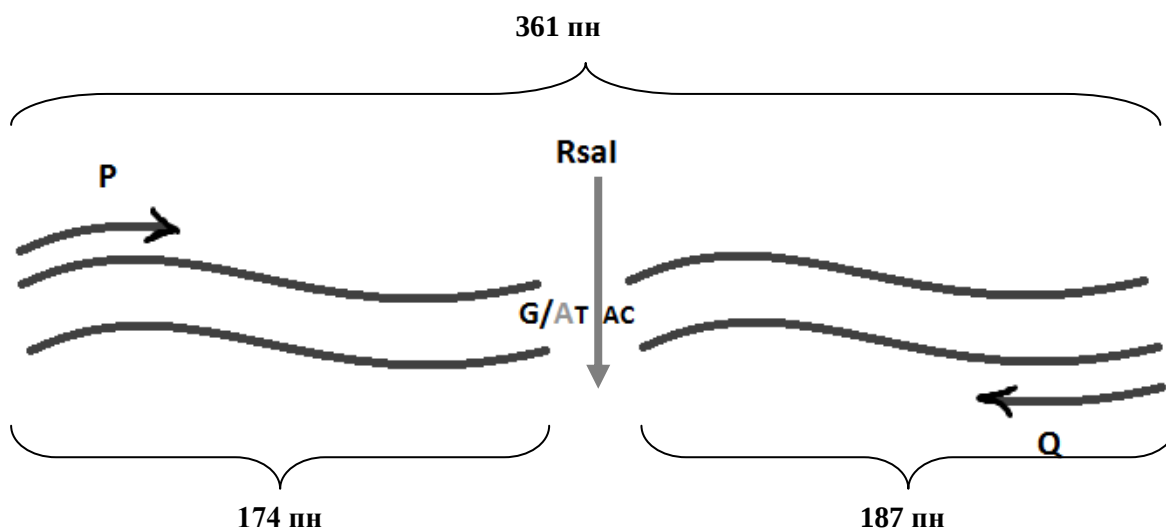


Рис.2 Схема ПЦР-ПДРФ анализа полиморфизма, ведущего к аминокислотной замене Р685S в гене *HIVER2*.

P- прямой праймер, Q – обратный праймер,

RsaI – эндонуклеаза рестрикции, узнающая сайт GTAC.

Проведение ПЦР

1. Перед проведением реакции подготовить все необходимые реагенты из наборов для ПЦР (фирма производитель «IsoGene», Москва), каждый из праймеров. Растворитель перемешать коротким вортексированием, сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).
2. Промаркировать необходимое количество пробирок для проведения ПЦР на 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого амплификатора и используемого набора для ПЦР) с учетом пробирки для отрицательного контроля (К-).
3. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество образцов, согласно таблице 1, добавляя реагенты в указанной последовательности. Тщательно перемешать на вортексе реакционную смесь и сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).

Таблица 1. Приготовление реакционной смеси для ПЦР*

№	Компонент	Количество
1	Вода для ПЦР	7 мкл
2	Растворитель	10 мкл
3	Праймер 1, 10 мкМ	1 мкл
4	Праймер 2, 10 мкМ	1 мкл

* Реакционную смесь готовят с запасом на 1 реакцию

4. В каждую промаркированную пробирку для ПЦР внести по 19 мкл приготовленной реакционной смеси.
5. В пробирку с отрицательным контролем (К-) добавить 1 мкл воды для ПЦР.
6. В каждую пробирку для опытного образца добавить 1 мкл образца ДНК.
7. Тщательно перемешать на вортексе реакционную смесь и сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).
8. Перенести пробирки в блок амплификатора (например, GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler фирмы «Applied Biosystems») и запустить программу амплификации: первоначальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, далее 35 циклов: 94°C в течение 30 сек, 57°C в течение 30 сек и 72°C в

течение 30 сек. Заключительная достройка концов фрагментов ДНК при 72°C в течение 7 мин.

Рестрикционный анализ ПЦР-продуктов

1. Разморозить при комнатной температуре буфер для эндонуклеазы рестрикции *RsaI*. Тщательно перемешать на вортексе и сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).
2. Эндонуклеаза рестрикции находится в незамерзающем растворе, поэтому ее размораживать не надо.
3. Приготовить в отдельной пробирке реакционную смесь для рестрикции на необходимое количество образцов (полученных ПЦР-продуктов, включая продукт отрицательного контроля К-) согласно таблице 2, добавляя реагенты в указанной последовательности.
4. Тщательно перемешать на вортексе реакционную смесь и сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).

Таблица 2. Приготовление реакционной смеси для рестрикции*

№	Компонент	Количество
1	Вода для ПЦР	13-Х мкл
2	Буфер для <i>RsaI</i> , x10	2 мкл
3	Эндонуклеаза рестрикции <i>RsaI</i> **	Х мкл 5 ед.а./реакцию***

* Реакционную смесь готовят с запасом на 1 реакцию

** Ферменты рестрикции достают из морозильной камеры непосредственно перед внесением в реакционную смесь.

*** Необходимый объем фермента рассчитывают в зависимости от активности *RsaI*, указанной на упаковке в (ед.а./мкл).

5. Реакционную смесь перемешать и инкубировать при температуре 37°C в течение 1 часа.

Анализ продуктов рестрикции путем их визуализации в 2%-ном агарозном геле

Проведение электрофореза в 2%-ном агарозном геле

1. Приготовить 2%-ный агарозный гель, как описано в задаче 2, используя 2,5 г агарозы на 125 мл буфера TAE x1.
2. По окончании рестрикции добавить к каждому образцу 2 мкл раствора для нанесения проб на гель.
3. Внести пробы в лунки геля. В отдельные лунки геля внести образец нерестрицированного ПЦР-продукта, образец ПЦР-продукта отрицательного контроля и ДНК-маркер молекулярного веса.
4. Провести электрофорез при 5-10В/см до тех пор, пока краситель не продвинется на 4-5 см.
5. Сфотографировать гель в коротковолновом УФ-свете с помощью лабораторной системы видеорегистрации гелей.
6. Определить размеры рестрикционных фрагментов путем сравнения с размерами фрагментов ДНК-маркера молекулярных весов.
7. Определить генотипы образцов ДНК по исследуемому полиморфизму P685S NIVER2 согласно данным, представленным на рис. 3.

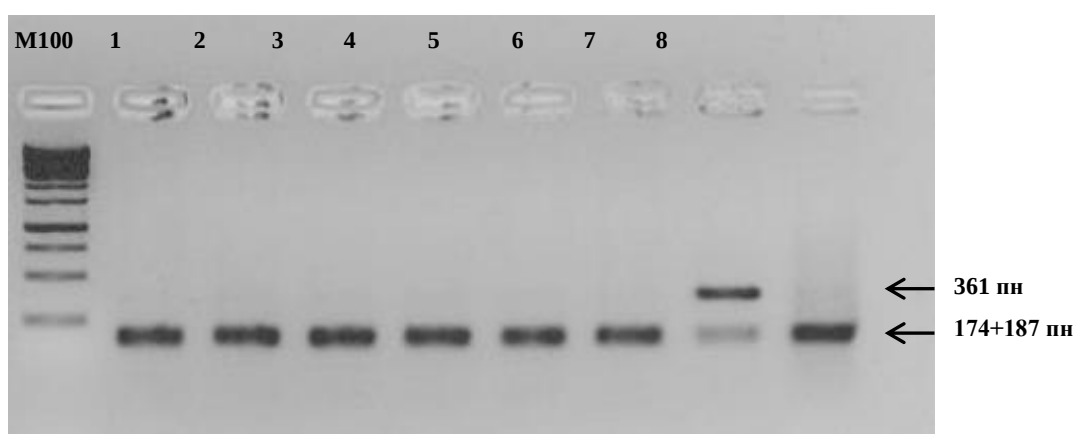


Рис.3 Результаты разделения фрагментов ДНК при анализе полиморфных вариантов маркера P685S гена NIVER2 в 2% агарозном геле после гидролиза рестриктазой *RsaI*. M100 – молекулярных весов, дорожки 1-6, 8 – GG, дорожка 7 – образец с генотипом AG.

Как видно из рисунка 3, образцы 1-6, 8 гидролизуются эндонуклеазой рестрикции *RsaI*, что свидетельствует о том, что эти образцы ДНК содержат гомозиготные аллели GG. Образец 7 является гетерозиготой, т.е. несёт аллель А и аллель G, поскольку подвергается частичному гидролизу эндонуклеазой *RsaI*, в результате которого происходит образование продуктов гидролиза размером 174 п.н. и 187 п.н., а также выявляется негидролизированный продукт размером 361 п.н.

Задача 3. Определение аллельного полиморфизма гена *APOE*

Цель задачи: определение генотипов образцов ДНК методом ПЦР-ПДРФ.

Определение полиморфных аллелей гена *APOE* ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$), кодирующих различные изоформы белка *APOE* (E2, E3 и E4) проводят с помощью метода ПЦР-ПДРФ (Голенкина и др., 2010). Для этого ПЦР-продукты, полученные с помощью праймеров, фланкирующих участок, содержащий полиморфные варианты гена *APOE*, обрабатывают эндонуклеазой рестрикции, и полученные фрагменты анализируют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Рестрикционная карта амплифицируемого фрагмента и размеры продуктов рестрикции приведены на рис. 4.

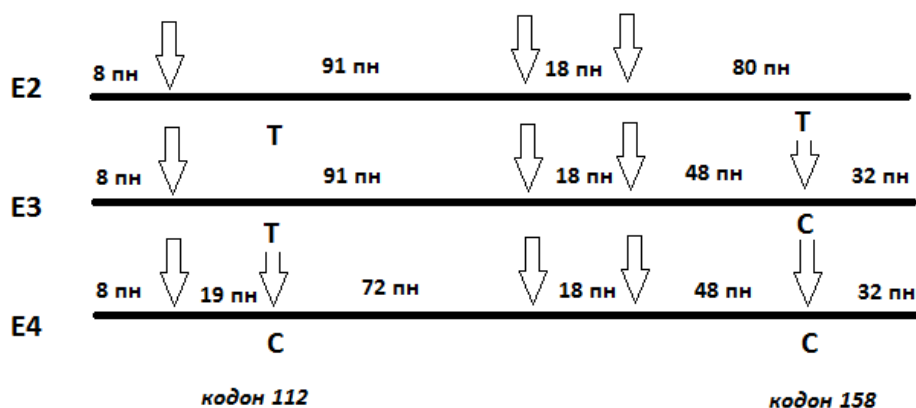


Рис.4 Схема ПЦР-ПДРФ анализа полиморфизма гена *APOE*.

Проведение ПЦР и рестрикционный анализ

ПЦР и рестрикционный анализ локуса АРОЕ проводят аналогично описанным методам в Задаче 2 с небольшими изменениями:

1. Программа амплификации локуса АРОЕ: первоначальная денатурация при 95°C в течение 4 мин, 5 циклов: 94°C в течение 45 сек, 64°C в течение 25 сек и 72°C в течение 30 сек: далее 30 циклов: 95°C в течение 5 сек, 64°C в течение 15 сек и 72°C в течение 5 сек. Заключительная достройка концов фрагментов ДНК при 72°C в течение 4 мин.
2. Для рестрикции использовать эндонуклеазу рестрикции *Bst*ННІ (НПО «СибЭнзим»). Гидролиз проводить при температуре 50°C в течении 6 часов (или в течение ночи).

Анализ продуктов рестрикции путем их визуализации в 8%-ном полиакриламидном геле

Перед началом работы необходимо приготовить исходные растворы (общие для всех студентов):

1. 30%-ный раствор акриламида (29 г акриламида и 1 г N,N'-метиленбисакриламида растворить в стеклянной посуде в 90 мл дистиллированной воды, довести объем до 100 мл)
2. 10%-ный раствор персульфата аммония (100 мг персульфата аммония растворить в 1 мл дистиллированной воды в пробирке типа «эппендорф» объемом 1,5-2 мл).

Приготовленные растворы следует хранить при температуре +4-6°C.

Проведение электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле.

1. Для приготовления 8% полиакриламидного геля смешать 10,6 мл 30%-ного раствора акриламида, 4 мл 10х буфера TBE и 100 мкл персульфата аммония. Добавить к раствору 24 мкл TEMED и сразу же залить гель между стеклянными пластинами для электрофореза со вставленной гребенкой.
2. После полимеризации геля (30-40 мин при комнатной температуре) удалить гребенку, установить пластины с гелем в камеру для вертикального электрофореза, наполнить камеру 1-кратным буфером TBE, промыть тем же буфером лунки геля.
3. К каждому образцу полученного ПЦР-продукта добавить 6-кратный раствор красителя для нанесения образцов на гель и внести по 10 мкл полученной смеси в лунки приготовленного полиакриламидного геля. В отдельные лунки геля внести образец ПЦР-продукта отрицательного контроля и ДНК-маркер молекулярного веса.
4. Провести электрофорез при 8 В/см до тех пор, пока краситель не пройдет $\frac{3}{4}$ длины геля.
5. Окрасить гель раствором бромистого этидия в течение 10-15 минут и сфотографировать в коротковолновом УФ-свете с помощью лабораторной системы видеорегистрации гелей.
6. Определить размеры рестрикционных фрагментов путем сравнения с размерами фрагментов ДНК-маркера молекулярных весов.
7. Определить генотипы образцов ДНК по исследуемому полиморфизму в гене *AROE* согласно данным, представленным на рис. 5.

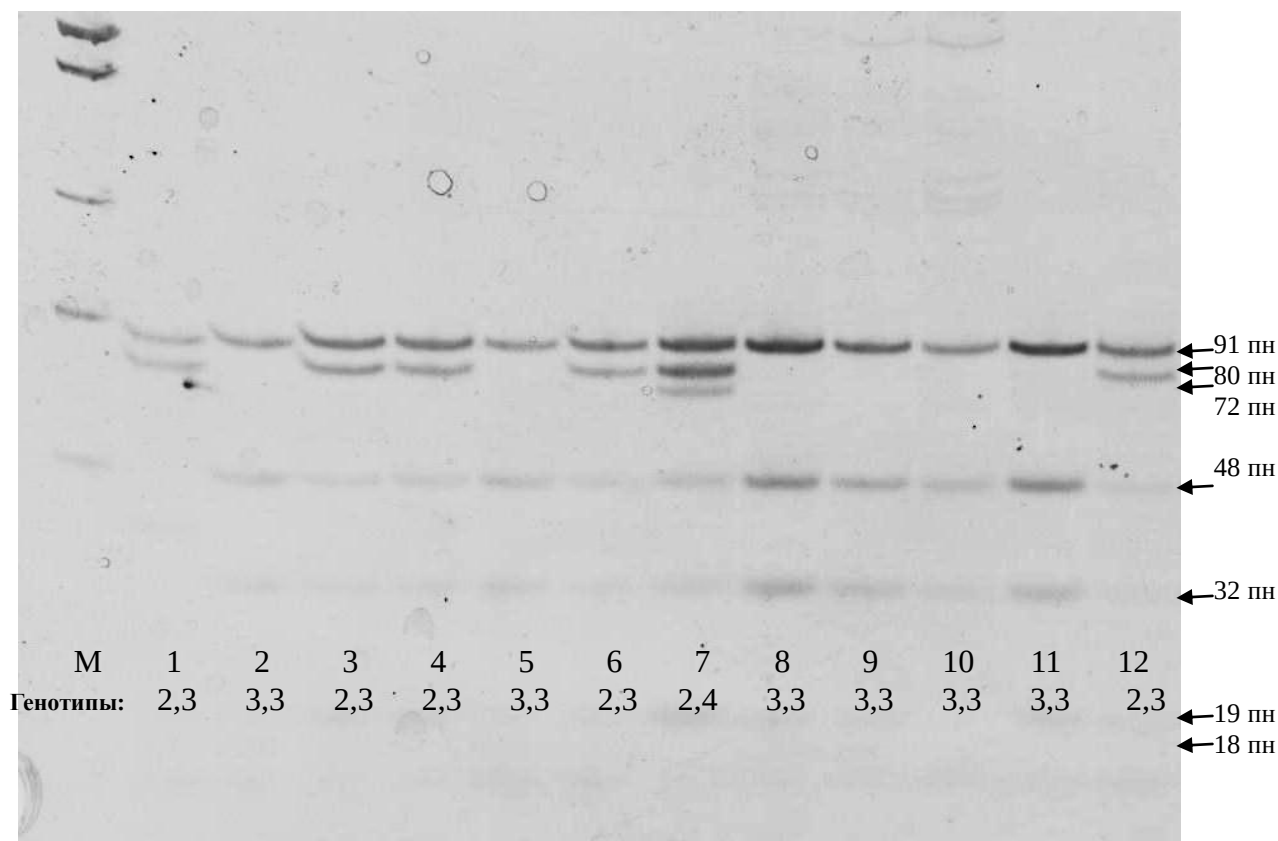


Рис. 5. Результаты разделения фрагментов ДНК при анализе полиморфных вариантов гена *APOE* в 8%-ном полиакриламидном геле после гидролиза рестриктазой *Bst*ННІ. 1 – маркер молекулярных весов. Дорожки 2, 5, 8-11 – образцы с генотипом $\epsilon 3 \epsilon 3$; дорожки 1, 3, 4, 6, 12 – образцы с генотипом; дорожка 7 – образец с генотипом $\epsilon 2 \epsilon 4$.

Задача 4. Определение аллельного полиморфизма в хромосомном локусе человека, методом прямого секвенирования, на примере локуса гена *ZACN*.

Цель задачи: определение генотипов образцов ДНК методом прямого секвенирования.

Определение аллельного полиморфизма 17:74076014, С/Т в гене *ZACN* проводят с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. Для этого сначала

получают ПЦР-продукты, содержащие полиморфный участок гена *ZACN*. Проводят предварительный отбор фрагментов необходимой длины с помощью визуализации и вырезания из агарозного геля. Вырезанные ПЦР-продукты очищают от геля с помощью специальных коммерческих наборов. После чего ставят реакцию секвенирования, в которой в качестве матрицы выступают очищенные ПЦР-продукты, анализируемого участка. В результате реакции происходит синтез комплиментарных одноцепочных продуктов с одного из двух праймеров, фланкирующих исследуемый локус, в состав которых входят модифицированные нуклеотиды, несущие флуоресцентные метки. Вновь образованные продукты очищают от остаточных дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, праймеров, полимеразы и ионов буфера. Дальнейший анализ очищенных продуктов реакции секвенирования проводится на приборе капиллярном секвенаторе. Принцип работы капиллярного секвенатора заключается в разделении одноцепочных продуктов с помощью электрофореза в геле с точностью до одного нуклеотида и последовательной детекции флуоресценции разделенных продуктов. Каждый из четырех нуклеотидов маркируется определенным красителем. Данные по интенсивности и спектру излучения сохраняются и представляются в виде определенной нуклеотидной последовательности.

Проведение ПЦР

ПЦР локуса *ZACN* и визуализация в агарозном геле проводят аналогично описанным методам в Задаче 2 с изменениями в программе амплификации локуса *ZACN*:

Первоначальная денатурация при 95⁰С в течение 4 мин, затем 35 циклов: 94⁰С в течение 30 сек, 58⁰С в течение 30 сек и 72⁰С в течение 30 сек. Заключительная достройка концов фрагментов ДНК при 72⁰С в течение 7 мин.

Очищение продуктов ПЦР

Полученные продукты ПЦР необходимо очистить от праймеров, ферментов, ионов и возможных продуктов неполного отжига. Для этого пробы разгоняют в агарозном геле, и вырезают фрагменты необходимой длины. Затем их выделяют из агарозного геля с помощью коммерческих наборов. Принцип этих наборов основан в растворении геля в специальном буфере, осаждение продуктов ПЦР на колонку, несколько стадий промывания от остатков геля и элюирование с помощью Трис-содержащего буфера или ультрачистой воды (Milli Q).

1. При проведение электрофореза в агарозном геле необходимо тщательно промыть камеру, заливочный столик, гребенки, плашку 10% хлорным раствором, многократно ополоснуть дистиллированной водой. Приготовить свежий раствор 1% ТАЕ буфера и залить свежий гель.
2. ПЦР-продукты следует наносить через 1-2 лунки.
3. Условия электрофореза 1 час при 100 В. Следует проводить электрофорез до тех пор, пока фрагменты достаточно хорошо разойдутся в геле и будут легко отделимы друг от друга.
4. Во время проведения электрофореза приготовить новые пробирки на 2 мл, подписать номера образцов. Приготовить один набор из присутствующих в наличие инструментов для вырезания проб:
 - а. пипетку на 1000 мкл и специальные наконечники для вырезания продуктов из геля;
 - б. скальпель со сменными лезвиями;
 - с. скальпель, 70% спиртовой раствор, горелку.
5. Сфотографировать гель в коротковолновом УФ-свете с помощью лабораторной системы видеорегистрации гелей.
6. Обязательно использовать защитную маску или очки на глаза и лицо. В связи с тем, что УФ-излучение вызывает мутации в нуклеотидных

последовательностях, необходимо разрезать гель на части и последовательно вносить в трансиллюминатор. Вырезание фрагментов должно проводиться аккуратно и быстро. Каждый образец следует вырезать индивидуальным наконечником (лезвием), или каждый раз обрабатывать лезвие скальпеля 70% спиртом и прожигать до тех пор, пока спирт не испариться.

7. Вырезанные фрагменты из геля поместить в заранее приготовленные пробирки.
8. Далее проводится выделение проб из геля с помощью коммерческих наборов. Следует четко следовать инструкции, приложенной к используемому коммерческому набору.

Проведение реакции секвенирования

Перед проведением реакции секвенирования необходимо оценить концентрацию очищенных образцов. Для этого можно использовать один из следующих методов:

- Визуализация при помощи электрофореза в агарозном геле. Для этого наносят 3 мкл проб на гель. Прогоняют в течение 20-30 мин при 120 В. Если полосы проб четко видны, с ними продолжают дальнейшую работу.
- Измерение концентрации на флуорометре Qubit. Данная оценка является более точной и рекомендуемой.

Метод измерения концентрации на флуорометре Qubit.

Принцип работы прибора заключается в детекции излучения флуоресцентного красителя, который связывается с двухцепочной ДНК. Одноцепочные фрагменты нуклеиновых кислот при этом не детектируются. Высокая чувствительность метода позволяет определять двухцепочечную ДНК в низких концентрациях, диапазон которых зависит от набора, выбранного для

измерения. Например, набор Qubit® dsDNA BR Assay Kit измеряет концентрацию в широком диапазоне: 100 пг/мкл–1,000 нг/мкл, набор Qubit® dsDNA HS Assay Kit используется для измерений с высокой точностью в диапазоне 10 пг/мкл to 100 нг/мкл.

1. Перед измерением необходимо подготовить: тонкостенные прозрачные пробирки на 0,5 мкл, промаркировать на верхней поверхности крышки.
2. Приготовить раствор буфера, содержащий флуоресцентный краситель, исходя из расчета 200 мкл буфера и 1 мкл красителя на каждый образец. Необходимо учесть, что также надо приготовить флуоресцентный раствор для двух стандартных образцов с известной концентрацией, которые входят в набор.
3. Приготовить рабочий раствор, состоящий из буферного раствора с флуоресцентным красителем и пробы ДНК/стандарта, по таблице 3.*

Таблица 3. Приготовление рабочего раствора для измерения концентрации ДНК на приборе Qubit.

Компонент, мкл	Кол-во пробы, мкл	Кол-во буф. р-ра, мкл	Общий объём, мкл
Стандарт	10	190	200
Образец ДНК	1-20	180-199	200

*Перед внесением стандарты и образцы продуктов ПЦР следует тщательно перемешать на вортексе в течение 10 сек. Нанесение образцов должно проводиться в следующем порядке: стандарт 1, стандарт 2, и далее измеряемые образцы. После внесения всех компонентов, образцы необходимо снова тщательно перемешать на вортексе, затем инкубировать 2 минуты, для связывания красителя с молекулами двухцепочной ДНК.

4. Измерение на приборе (следовать инструкции на мониторе): включить прибор, → выбрать тип измеряемых молекул ДНК и набор (HS/BR); → провести калибровку (New calibration), → внести в прибор стандарт 1, затем

стандарт 2, → далее измерить образцы, для расчета концентрации в исходном образце, необходимо указать количество внесенного образца.

Расчет реакции секвенирования



Схема1. Нуклеотидная последовательность локуса ZACN.

1. Количество ДНК образца, необходимое в реакцию секвенирования, рассчитывается по формуле:

$$Q = l/50,$$

где Q - количество ДНК образца,

l- длина ампликона.

Таким образом, для локуса ZACN размером 509 пн, будет достаточно около 10 -11 нг ДНК очищенного продукта ПЦР.*

$$*(Q=509/50= 10,18(\text{нг}))$$

2. Далее необходимо рассчитать для каждого образца объем ДНК и воды вносимый в реакцию. Полученные значения занести в таблицу 4:

Таблица 4. Расчет количества ДНК для внесения в реакцию секвенирования.

№	С(нг/мкл)	Vобр (мкл)	Vводы (мкл)
1			
2			
3			
K+			

Постановка реакции секвенирования

1. Перед проведением реакции необходимо подготовить все реагенты для постановки реакции секвенирования: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США), растворы праймеров, ДНК. Реакционная смесь BigDye содержит флюоресцентную метку, в связи с этим рекомендуется содержать её в месте без доступа света.
2. Промаркировать необходимое количество пробирок для проведения ПЦР на 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого амплификатора и используемого набора для ПЦР) с учетом пробирки для положительного контроля (K+).
3. Развести образцы ампликонов ПЦР согласно расчетной таблице 5. И внести в промаркированные пробирки по 4 мкл.
4. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество образцов, согласно Таблице 5, добавляя реагенты в указанной последовательности. Тщательно перемешать на вортексе реакционную смесь и сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).

Таблица 5. Приготовление реакционной смеси для реакции секвенирования*.

№	Компонент	Количество
1	Буфер	2 мкл
2	Праймер (прямой или обратный), 1 мкМ	2 мкл
3	BigDye (реак. смесь)	2 мкл

*.Реакционную смесь готовят с запасом на 1 реакцию

5. В каждую промаркированную пробирку внести по 6 мкл приготовленной реакционной смеси.
6. Тщательно перемешать на вортексе реакционную смесь и сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).
7. Перенести пробирки в блок амплификатора (например, GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler фирмы «Applied Biosystems») и запустить программу амплификации: первоначальная денатурация 96°C в течение 1 мин, затем 25 циклов: 96°C в течение 10 сек, 50°C в течение 10 сек и 60°C в течение 4 мин.

Очищение продуктов реакции секвенирования при помощи гель-филтрации.

Очистку продуктов реакции секвенирования можно проводить различными способами. Одним из эффективных способов является очистка за счет гель-филтрации на колонках DyeEx, предлагаемой коммерческой фирмой Qiagen.

1. Провести денатурацию образцов, добавлением 1 мкл 2% SDS и ингибированием при 95°C в течение 5 мин, далее охладить до комнатной температуры.
2. Перейти к очищению проб, следуя протоколу DyeEx 2.0 Spin Kit.

Секвенирование и анализ данных.

В очищенные после реакции секвенирования пробы добавляют по 20 мкл высокоочищенного формамида. Добавление формамида необходимо т.к. в его растворе происходит расплетание молекул ДНК.

Весь объем смеси формамида с очищенной секвенирующей реакцией полностью переносится в лунки плашки для секвенирования. Данные плашки могут содержать как 96 так и 384 лунки, использование плашек зависит от рабочего прибора (секвенатора). Некоторые приборы, например ABI PRISM 3130 фирмы Applied Biosystems, могут использовать как 96- так и 384-луночные плашки.

После нанесения проб, плашка закрывается специальной резиновой септой. Затем необходимо кратко отцентрифугировать плашку и поставить её в секвенатор.

Далее оператор устанавливает подходящую программу секвенирования и запускает прибор.

В результате должны быть получены данные в виде флуорограммы, на которой после анализа с помощью программного обеспечения будет детектирована нуклеотидная последовательность образцов исследуемого локуса, степень флуоресценции и качество. При наличии гетерозиготы в полиморфном локусе ZACN наблюдается детекция обеих красок (синий – С, зеленой – Т) с равной степенью флуоресценции, при этом сигнал обоих излучений будет составлять примерно половину от среднего сигнала гомозиготных аллелей данного образца. Пример приведен на рис. 6.

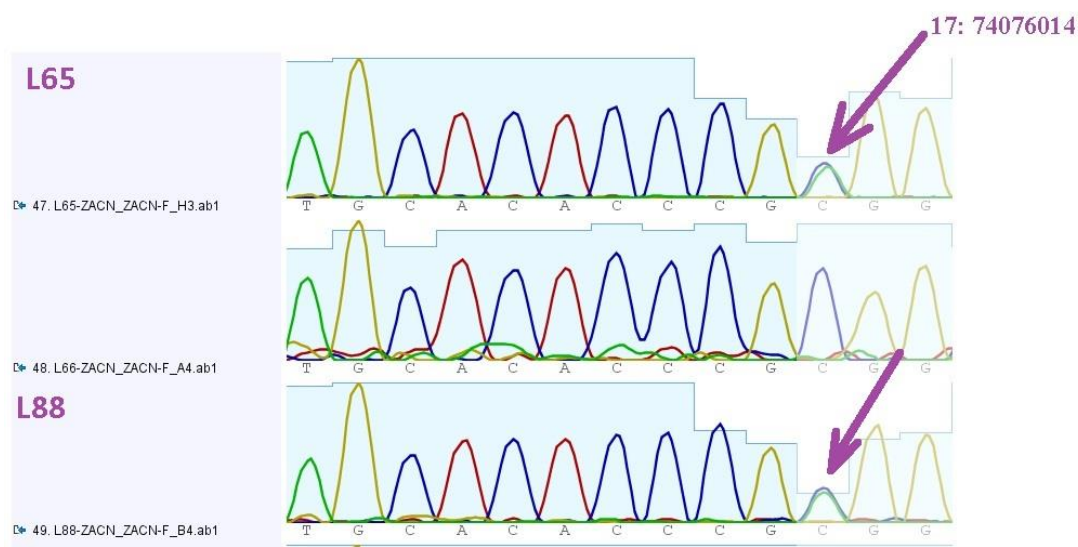


Рис. 6. Флуорограмма секвенирования участка локуса ZACN с полиморфным аллелем С/Т.

РАЗДЕЛ 2. Анализ длины теломерных повторов в геноме человека.

Задача 5. Определение длины теломерных повторов методом количественного анализа ПЦР в реальном времени.

Цель задачи: провести измерение относительной и абсолютной длины теломерных повторов образцов ДНК.

Количественный анализ длины теломерных повторов выполняется с помощью системы ПЦР в реальном времени. По сравнению со стандартным методом ПЦР данный метод позволяет детектировать и измерять количество синтезируемого продукта на каждом последующем цикле амплификации. Детекция синтезируемого продукта проводится за счет специальных флуоресцентных красителей, входящих в состав ПЦР смеси. Существует два основных вида флуоресцентных систем: зонды, в состав которых входят флуоресцентные метки, и флуоресцентные красители, интеркалирующие в двухцепочные молекулы ДНК. Для данного метода анализа применяется система интеркалирующего красителя Sybr Green. Определение количества ДНК в образце происходит за счет построения стандартной кривой, для этого готовят серию из 5 последовательных разведений стандартного образца ДНК с точно известной концентрацией, после чего по ним строится график зависимости порогового цикла (Ct) от исходной концентрации матрицы – стандартной кривой (рис. 7). Количество внесенного образца определяют методом интерполяции с данным графиком.

Для проведения ПЦР в реакции амплификации теломерных повторов используется пара праймеров, не полностью комплементарная цепи ДНК, позволяющая исключить появление димеров праймеров (O’Callaghan, 2011). Структура праймеров приведена рис. 7.

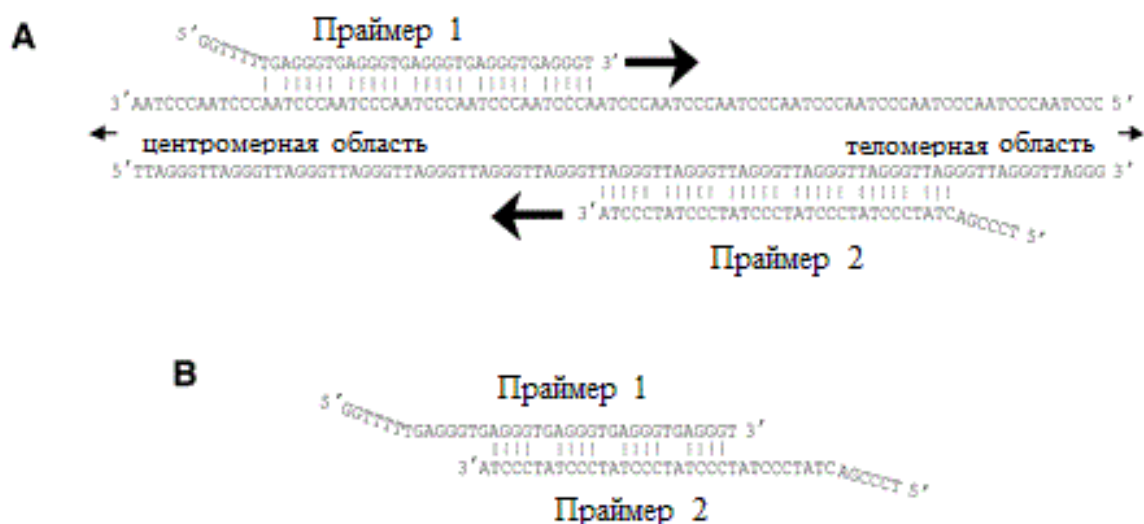


Рис 7. Структура праймеров для амплификации теломерных повторов (по Cawthon *et al.*, 2002)

Каждый шестой нуклеотид не комплементарен матрице, причем при посадке праймеров (А) на ДНК 3'-конец полностью комплементарен, позволяя полимеразе начать синтез. При попытке образования димеров праймеров (В) последний нуклеотид на 3'-конце оказывается некомплементарным, из-за чего синтез новой цепи не начинается.

Для проведения относительного количественного анализа необходим референсный локус ДНК, количество повторов которого будет неизменно во всех анализируемых образцах. В данном методе в качестве референсного локуса выбран ген 36B4 (он же RPLP0) - рибосомный фосфопротеин РО.

Определение количества теломер и референсного гена должно проводится на одном планшете (для уменьшения влияния внешних условий). Каждый образец (и экспериментальный и стандартный) ставится в 3 технических повторах.

Для каждого локуса строится соответствующая стандартная кривая, в качестве стандартов используются искусственно синтезированные олигонуклеотиды: (TTAGGG)₁₄ для теломерных повторов и CAGCAAGTGGGAAGGTGTAA TCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTGTACCCGTTGATGATAGA ATGGG для гена 36B4.

Проведение ПЦР в реальном времени.

1. Измерить концентрацию исследуемых образцов ДНК с помощью прибора Qubit (как описано в задаче 4).
2. Образцы ДНК развести до концентрации 3 нг/мкл в объеме не менее 30 мкл. Для разведения ДНК желательно использовать Tris-содержащий буфер, также можно использовать ультрачистую воду (Milli Q). При разведении необходимо тщательно перемешивать образцы ДНК не менее 10 секунд на вортексе.
3. Сделать серию из 5 10-кратных последовательных разведений стандартных образцов, (общую для всех студентов). Необходимо использовать тот же буфер, который был выбран для разведения образцов ДНК. Для каждого стандарта готовят еще 4 промаркированные пробирки, и вносят в каждую пробирку по 45 мкл буфера. Отдельно разводят стандарты до концентрации 10 нМ в объеме 50 мкл. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 10 секунд. Далее из полученного разведения отбирают 5 мкл и вносят в пробирку с буфером и тщательно перемешивают, таким образом получают 1 нМ разведение. Далее из последней отбирают 5мкл и вносят в следующую пробирку с буфером и т.д. Таким образом, получают серию последовательных разведений 10 нМ, 1 нМ, 100 пМ, 10 пМ, 1 пМ. Важно следить за тем, чтобы каждое последующее разведение было тщательно перемешено.
4. Приготовить таблицу, где расписать положение стандартов и образцов на плашке (таблица 6). Внести данные на прибор амплификатор в реальном времени, (например 7500 Real-Time PCR System).

Таблица 6. Положение образцов на плашке ПЦР в реальном времени.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	Tel -1	Tel -1	Tel -1	Tel -2	Tel -2	Tel -2	Tel -3	Tel -3	Tel -3	Tel -4	Tel -4	Tel -4
b	Tel -5	Tel -5	Tel -5	1	1	1	2	2	2	3	3	3
c	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7
d	8	8	8	9	9	9	10	10	10	K-	K-	K-
e	36B - 1	36B - 1	36B - 1	36B - 2	36B - 2	36B - 2	36B - 3	36B - 3	36B - 3	36B - 4	36B - 4	36B - 4
f	36B - 5	36B - 5	36B - 5	1	1	1	2	2	2	3	3	3
g	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7
h	8	8	8	9	9	9	10	10	10	K-	K-	K-

Tel -1 – разведение теломерного стандарта; 36B – разведение стандарта референсного гена; 1-10 – исследуемые образцы; K- отрицательный контроль.

- Подготовить все необходимые реагенты из наборов для ПЦР (GoTaq® qPCR Master Mix, Промега). Преподаватель разводит праймеры до конечной концентрации 10 мкМ. Растворитель перемешать коротким вортексированием, сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).
- Приготовить две реакционные смеси для каждой из системы праймеров на необходимое количество образцов, согласно таблице 7, добавляя реагенты в указанной последовательности. Необходимо учесть, что каждый образец, в том числе каждое разведение стандартного образца, ставится в 3 повторах на исследуемый локус, а также на референсный ген. Тщательно перемешать на вортексе реакционную смесь и сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).

Таблица 7. Приготовление реакционной смеси для ПЦР*.

№	Компонент	Количество
1	Вода для ПЦР	0,245 мкл
2	GoTaq qPCR Master Mix, 2X	7,5 мкл
3	Праймер 1, 10 мкМ	0,405 мкл
4	Праймер 2, 10 мкМ	1,35 мкл
	Референсный краситель CXR	1,5 мкл

* Реакционную смесь готовят с запасом на 1 реакцию

- В каждую лунку плашки для ПЦР в реальном времени внести по 11 мкл приготовленной реакционной смеси.
- В лунки с отрицательным контролем (K-) добавить 4 мкл воды для ПЦР.

11. В каждую лунку, согласно таблице 7, внести 4 мкл в 3х повторах разведения стандартов и исследуемые образцы ДНК.
12. Заклеить пленкой для ПЦР в реальном времени. Тщательно перемешать на вортексе реакционную смесь и сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд).
13. Перенести пробирки в блок амплификатора (например, 7500 Real-Time PCR System) и запустить программу амплификации: предварительная денатурация ДНК: 95°C – 10 мин; 40 циклов амплификации: 95°C –15 сек, 60°C – 1 мин; получение данных по кривой плавления для анализа специфичности.

Определение относительной длины теломер.

В результате проведенной ПЦР-реакции с помощью стандартной кривой для каждого образца получено количество копий гена 36B4, а также количество теломерных повторов (ТП) (Рис.7,8). Так как в обеих реакциях (для определения количества теломерных повторов и количества копий гена 36B4) было внесено одинаковое количество матрицы, то при делении числа теломерных повторов на число копий гена 36B4 будет получена абсолютная длина теломерных повторов (АДТП) в пересчете на 1 геном. Относительную длину теломерных повторов (ОДТП) определяют, нормируя полученные данные на референсный образец (РЕФ), который ставился в каждом эксперименте. Таким образом, итоговая формула для определения относительного числа теломерных повторов:

$$\text{ОДТП} = (\text{ТП} / 36\text{B4}) / \text{РЕФ}$$

Статистическая обработка проводится с помощью программного обеспечения Statistica 8.0

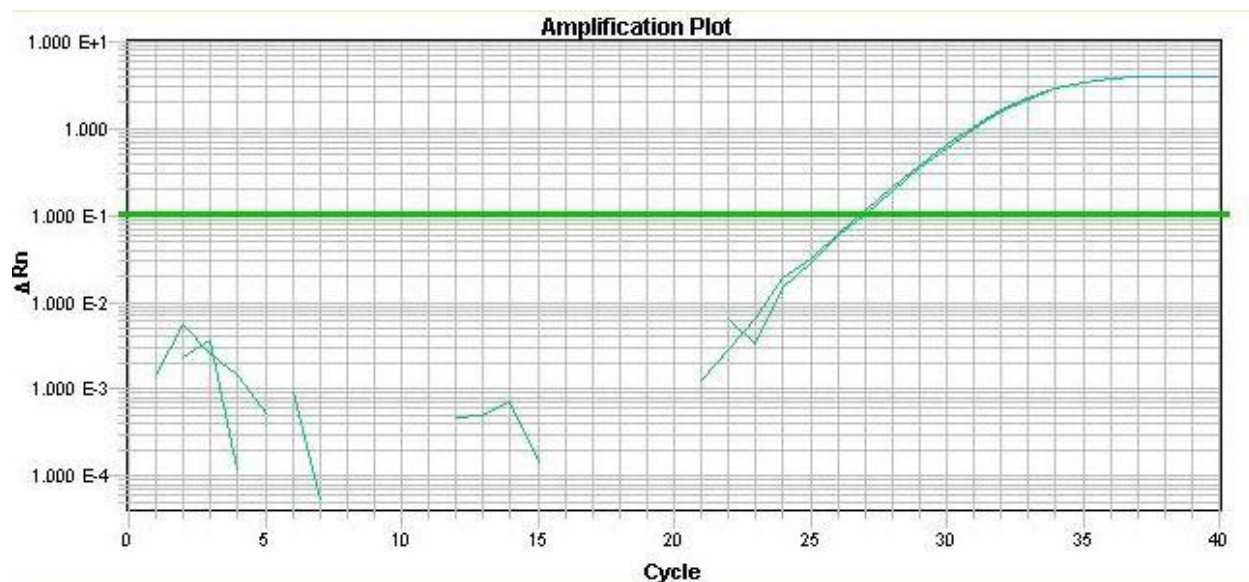


Рис 8. Кривые накопления ДНК в ходе ПЦР, полученные для двух технических повторов одного образца (мишень – ген 36В4) в логарифмическом масштабе.

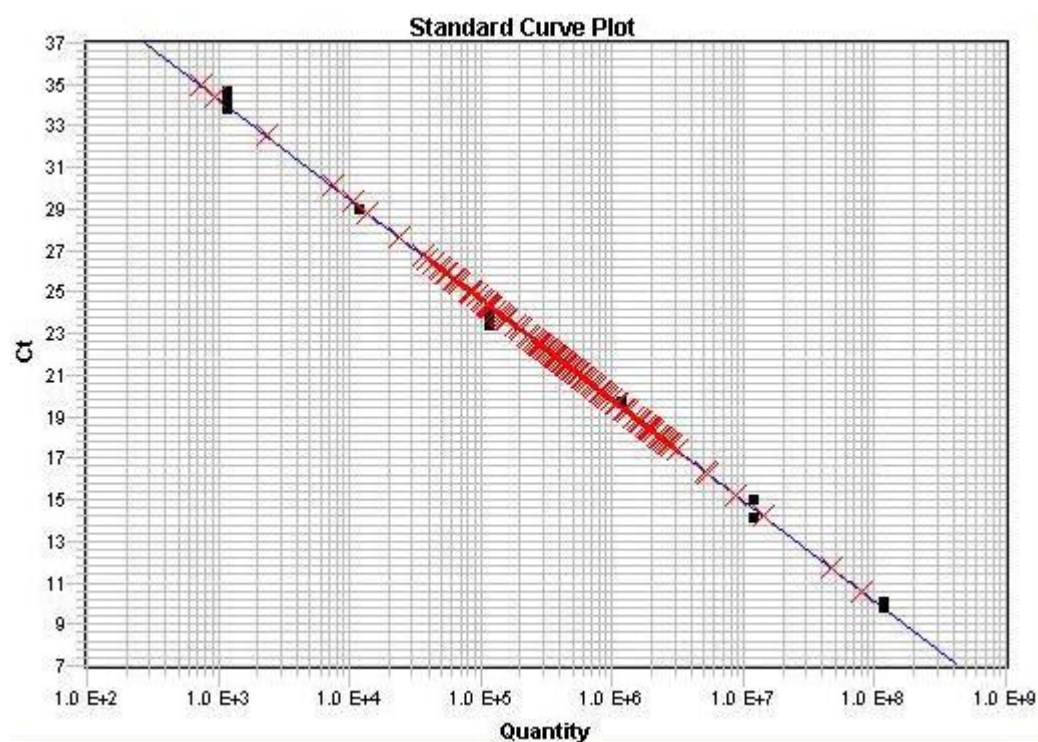


Рис. 9. График зависимости порогового цикла от количества матрицы, внесенной в реакцию (стандартная кривая) для гена 36В4. Черным цветом показаны значения для стандартов, красным – для неизвестных образцов.

Задача № 6. Оценка количества теломерных повторов в данных полногеномного секвенирования

Цель задачи: разработать программу для анализа количества теломерных повторов в данных полногеномного секвенирования.

На основе подсчета количества теломерных повторов в коротких прочтениях и количества прочтений теломерными повторами проводится оценка общей длины теломерных повторов в секвенированном образце. Каждый студент пишет программу на языке программирования, которым он владеет для подсчета этих статистик.

Ход работы:

1. Перед началом работы студенты знакомятся с форматами представления данных глубокого секвенирования: .fastq и .sra
2. Далее загружают данные из базы SRA (Sequence Read Archive) секвенирования генома макаки-резус:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX112027>
3. Для упрощения работы эти данные конвертируются в текстовый формат fastq с помощью утилиты sra-toolkit
(<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/?view=software>)
4. Для первых 1 млн коротких прочтений студенты проводят оценку количества прочтений с одним шестинуклеотидным теломерным повтором (TTAGGG), с двумя теломерными повторами и так далее.
5. Выведенная статистика из файла с разделителями с табуляцией загружается в Microsoft Excel. Студенты строят гистограмму доли прочтений с разным количеством теломерных повторов от общего количества прочтений (рис. 10).



Рис. 10. Пример гистограммы, построенной по данным полногеномного секвенирования человека парными прочтениями длиной 100 нуклеотидов.

6. Производится расчет вероятности получения прочтения с заданным количеством теломерных повторов.

Студенты предлагают наиболее корректный способ оценки доли теломерных повторов в геноме, с учетом того, что не все 6-ти буквенные последовательности TTAGGG происходят из теломерных повторов, и делают вывод.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешковский И.А., Ионцев В.А. (2012). Демографический фактор в развитии России в условиях глобализации. *Demography*, Т. 9.
2. Рощина Я. М. (2010). Динамика и структура потребления алкоголя в современной России. *Вопросы статистики*, №. 11: С. 38-46.
3. Шипицына Е.В., Оржесковская Е.А., Бабкина К.А., Савичева А.М., Микая Н.А., Орлова О.О., Юркова И.К. (2004). Определение вирусной нагрузки и статуса днк вируса папилломы человека 16 типа методом пцр в реальном времени. *Журнал Акушерства и Гинекологии*, LIII(4): 26-32.
4. Andrew T., Aviv A., Falchi M., Surdulescu G.L., Gardner J.P., Lu X., Kimura M., Kato B.S., Valdes A.M., and Spector T.D. (2006). Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *Am J Hum Genet*, 78: 480-486.
5. Aubert G., Hills M., and Lansdorp P.M. (2012). Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res*, 730: 59-67.
6. Blusewicz, M. J., Dustman, R. E., Schenkenberg, T., & Beck, E. C. (1977). Neuropsychological correlates of chronic alcoholism and aging. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 165(5): 348-355.
7. Cawthon R.M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 30: e47.
8. Cherkas L.F., Aviv A., Valdes A.M., Hunkin J.L., Gardner J.P., Surdulescu G.L., Kimura M., and Spector T.D. (2006). The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging Cell*, 5: 361-365.
9. Damm K., Hemmann U., Garin-Chesa P., Haul N., Kauffmann I., Priepke H., Niestroj C., Daiber C., Enenkel B., Guilliard B., Lauritsch I., Muller E., Pascolo E., Sauter G., Pantic M., Martens U.M., Wenz C., Lingner J., Kraut N., Rettig W.J., and Schnapp A. (2001). A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J*, 20: 6958-6968.
10. de Lange T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, 19: 2100-2110.
11. de Vos-Houben J.M., Ottenheim N.R., Kafatos A., Buijsse B., Hageman G.J., Kromhout D., and Giltay E.J. (2012). Telomere length, oxidative stress, and antioxidant status in elderly men in Zutphen and Crete. *Mech Ageing Dev*, 133: 373-377.

12. Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabhar F.S., Adler N.E., Morrow J.D., and Cawthon R.M. (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 17312-17315.
13. Filby A.L., and Tyler C.R. (2005). Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Biol Reprod*, 73: 648-662.
14. Glass D., Parts L., Knowles D., Aviv A., and Spector T.D. (2010). No correlation between childhood maltreatment and telomere length. *Biol Psychiatry*, 68: e21-22
15. Harbo M., Koelvraa S., Serakinci N., and Bendix L. (2012). Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, 11: 774-779.
16. Harley C.B., Futcher A.B., and Greider C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345: 458-460.
17. Hastie N.D., Dempster M., Dunlop M.G., Thompson A.M., Green D.K., and Allshire R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, 346: 866-868.
18. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., and Watson R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11: 1026-1030.
19. Ivankovic M., Cukusic Kalajzic A., Skrobot Vidacek N., Franic Simic I., Davidovic Mrsic S., and Rubelj I. (2012). Human Xp/Yp telomere analysis by Southern-STELA. *Biogerontology*, 13: 203-213.
20. Lindsey J., McGill N.I., Lindsey L.A., Green D.K., and Cooke H.J. (1991). In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res*, 256: 45-48.
21. Ma S.L., Lau E.S., Suen E.W., Lam L.C., Leung P.C., Woo J., and Tang N.L. (2013). Telomere length and cognitive function in southern Chinese community-dwelling male elders. *Age Ageing*.
22. McGrath M., Wong J.Y., Michaud D., Hunter D.J., and De Vivo I. (2007). Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16: 815-819.
23. Mengelle C., Sandres-Saune K., Pasquier C., Rostaing L., Mansuy J.M., Marty M., Da Silva I., Attal M., Massip P., and Izopet J. (2003). Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 41: 3840-3845.

24. Morrison T.B., Weis J.J., and Wittwer C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24: 954-958, 960, 962.
25. O'Callaghan N.J., and Fenech M. (2011). A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online*, 13: 3.
26. Samani N.J., Boulby R., Butler R., Thompson J.R., and Goodall A.H. (2001). Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet*, 358: 472-473.
27. Toutain J., Prochazkova-Carlotti M., Cappellen D., Jarne A., Chevret E., Ferrer J., Idrissi Y., Pelluard F., Carles D., Maugey-Laulon B., Lacombe D., Horovitz J., Merlio J.P., and Saura R. (2013). Reduced placental telomere length during pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *PLoS One*, 8: e54013.
28. Trka J., Kalinova M., Hrusak O., Zuna J., Krejci O., Madzo J., Sedlacek P., Vavra V., Michalova K., Jarosova M., Sary J., and For Czech Paediatric Haematology Working G. (2002). Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*, 16: 1381-1389.
29. van Steensel B., Smogorzewska A., and de Lange T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, 92: 401-413.
30. Sutherland, G., Sheahan, P., Matthews, J., Dennis, C., Sheedy, D., McCrossin, T., Curtis M. & Kril, J. (2013). The effects of chronic alcoholism on cell proliferation in the human brain. *Experimental Neurology*.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ И РАЗМЕРЫ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ПЦР-ПРОДУКТОВ

Номер задачи	Ген	Последовательность праймера	Размер ПЦР-продукта, п.н.
Задача 2	<i>HIVEP2</i>	ATCCACTCCTGACTCCTTCC	361
		TCAGCAGTTCATCCCTGAAG	
Задача 3	<i>APOE</i>	CGGCTGGGCGCGGACATGGAGGA	197
		TCGCGGGCCCCGGCCTGGTACAC	
Задача 4	<i>ZACN</i>	CTTTCAACACAGCGCTCAC	509
		TTCAGAGTTCTGGCAGTGG	
Задача 5	<i>Теломерные повторы</i>	CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT	
		TGGGTTTGGGTT	
	<i>RPLP0</i>	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCT	
		TACCCTTACCCT	
	<i>Tel</i>	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	
		CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	
	<i>36B</i>	(TTAGGG)14	
		CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCCGTC TCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTT GTACCCGTTGATGATAGAATGGG	