

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
"Научный Центр Психического Здоровья" РАМН

АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ РНК,
СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ БОЛЕЗНЕЙ МОЗГА

Методическое пособие к практикуму
«Генетика поведения когнитивных способностей.
Норма и патология»

Москва, 2012

УДК 577.215;616.89

ББК 28.04

А-64

Андреева Т.В., Кунижева С.С. Анализ регуляторных РНК, связанных с развитием мозга. Методическое пособие к практикуму «Генетика поведения когнитивных способностей. Норма и патология».

Под редакцией доктора биологических наук, профессора Е.И. Рогаева

ISBN 978-5-91587-065-8

В книге изложены теоретические и практические аспекты исследования регуляторных микроРНК. Подробно рассмотрены генетические методы анализа генов, кодирующих микроРНК. Приведена подробная методика выделения и анализа РНК, в том числе с использованием новейшего оборудования.

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

В Методическое пособие включены материалы, полученные в рамках проекта «Гены и транскрипция при болезни Альцгеймера», финансируемого Министерством образования и науки по Программе "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" (Госконтракт № 02.740.11.0854 от 28 июня 2010 г.)

Андреева Т.В., Кунижева С.С., Москва: Цифровичок. - 2012 г. - 42 с.

Научное издание

Андреева Татьяна Владимировна, Кунижева Светлана Станиславовна

Анализ регуляторных РНК, связанных с развитием мозга.

(Отпечатано с готового оригинал-макета)

ISBN 978-5-91587-065-8

© ИОГен РАН, 2012

© ФГБУ «НЦПЗ» РАМН, 2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Общие сведения о регуляторных РНК..... 4

МикроРНК в норме и при нейропсихических заболеваниях. 6

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Раздел 1. Базовые методы исследования микроРНК и их роли в развитии патологий человека. Анализ полиморфизмов в генах и хромосомных локусах с помощью ПЦР. 8

Задача 1. Определение аллельного полиморфизма на примере хромосомного локуса человека, содержащем ген *MIR9-2*..... 9

Задача 2. Определение аллельного полиморфизма на примере хромосомного локуса человека, содержащем ген *CR1*..... 15

Задача 3. Определение аллельного полиморфизма на примере хромосомного локуса человека, содержащем ген *APOE*..... 20

Задача 4. Анализ ассоциации полиморфизмов в локусах, кодирующих микро-РНК или в генах-мишенях микро-РНК..... 22

Задача 5 (факультативная). Сравнительный анализ частот встречаемости генотипов и аллелей в исследованных выборках с данными, представленными в литературе..... 24

Раздел 2. Исследование РНК

Задача 6. Выделение РНК из образцов тканей животных 26

Задача 7. Оценка качественных и количественных характеристик РНК 29

Задача 8. (факультативная) Оценка количества и качества РНК с помощью биоанализатора Agilent.2100.Bioanalyzer 31

Задача 9. Синтез первой цепи кДНК 34

Задача 10. Проведение ПЦР с использованием в качестве матрицы синтезированной кДНК 36

ЛИТЕРАТУРА..... 40

ПРИЛОЖЕНИЕ 41

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Общие сведения о регуляторных РНК

Одним из результатов реализации проекта по секвенированию генома человека стало выявление того факта, что число генов, кодирующих белки у человека, значительно меньше ($< 24000-30000$), чем ожидалось (>100000). Более того, число таких генов не отражает сложность организма, поскольку число генов у сравнительно простого беспозвоночного почвенного червя *Caenorhabditis elegans* больше, чем у *Drosophila melanogaster*, и близко к числу генов у человека. Известно, что большая часть генома человека ($>90-95\%$) представлена некодирующими последовательностями ДНК. Детальные исследования транскрипционной активности генома показали, что значительная доля некодирующих геномных последовательностей транскрибируется, то есть происходит образование РНК с возможными регуляторными функциями, многие из которых ещё не охарактеризованы. Наиболее активно исследуемым в настоящее время классом таких РНК являются микроРНК.

МикроРНК представляют собой класс небольших регуляторных РНК, контролирующих уровень транскриптов или белковых продуктов в клетке. Зрелые микроРНК представляют собой молекулы $\sim 19-24$ п.н., образуемые из более длинных РНК-предшественников ($\sim 70-100$ п.н.) и имеющих специфическую шпилечную структуру (рис. 1). МикроРНК формируют несовершенный дуплекс с 3'-UTR участками мРНК в составе комплекса RISC, что приводит к подавлению трансляции или деградации мРНК-мишени (Рогаев и др., 2008). МикроРНК могут формировать гетеродуплексы не только с 3'-UTR участками мРНК, но также с кодирующими участками, а также с 5'-UTR (Orom et al., 2008; Tay et al., 2008).

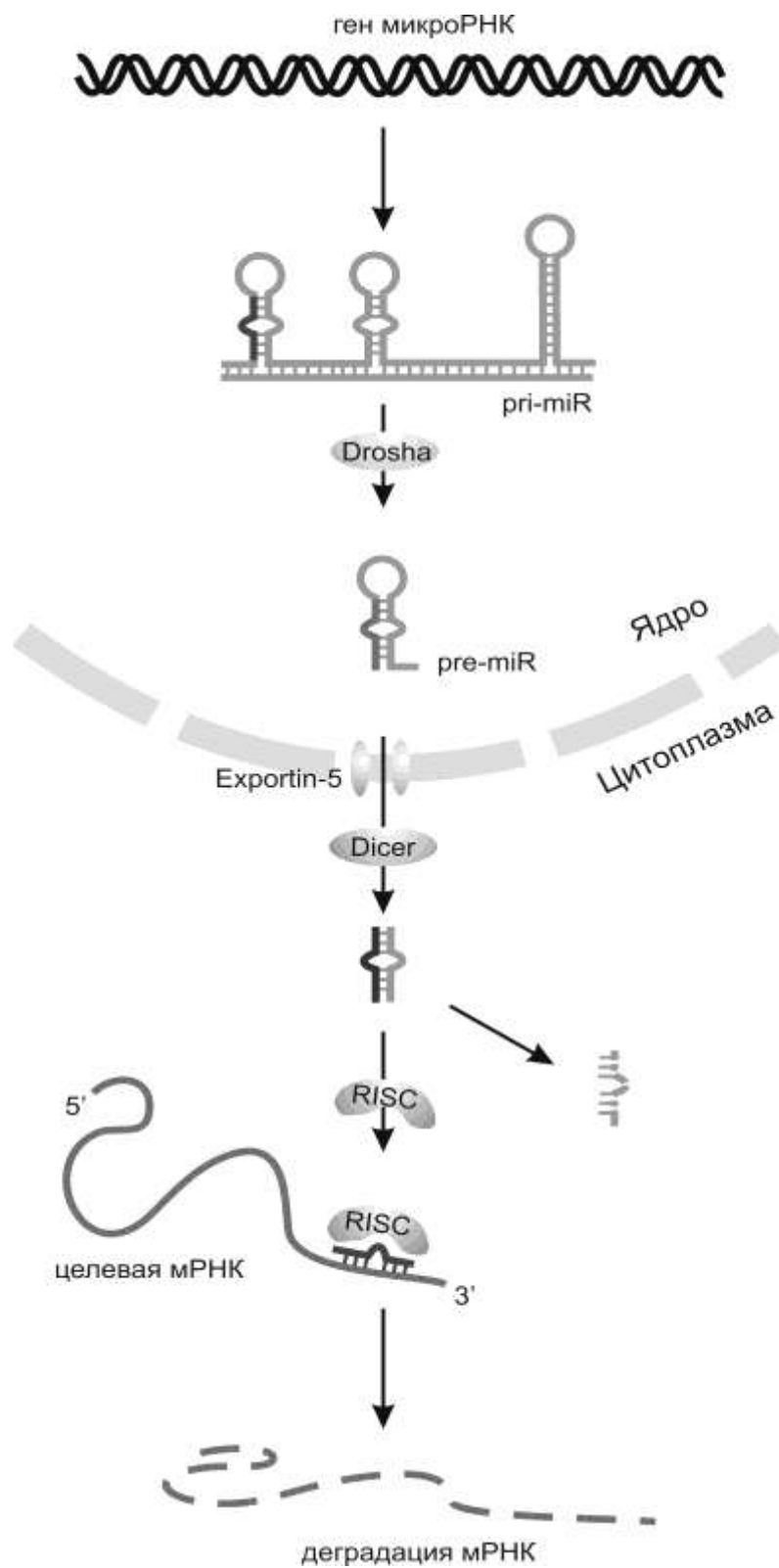


Рис. 1. Схема основного пути образования микроРНК

Некодирующие РНК млекопитающих выполняют множество функций, участвуя в процессинге и трансляции РНК, модификации тканеспецифичного редактирования РНК, в работе сплайсосомы, теломеразного комплекса, в компенсации дозы генов X-хромосомы, регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции и трансляции, в геномном импринтинге и других важных клеточных процессах. Прежние представления о незначимости функций белок-некодирующих РНК стали меняться относительно недавно. Было показано, что ряд некодирующих РНК (помимо рРНК, тРНК и сплайсосомных РНК) обнаруживаются не только в ядре, но и в цитоплазме, и продолжительность их жизни в клетке сравнима с продолжительностью жизни мРНК. Учитывая результаты недавних исследований, свидетельствующих о том, что большая часть генома может транскрибироваться и более 90% геномных последовательностей представлены в первичных транскриптах различных тканей (как это показано в проекте ENCODE при анализе участков, покрывающих 1% всего генома человека (The ENCODE Project Consortium), необходимо признать, что функции некодирующих РНК могут оказаться намного более значимыми, чем это представлялось ранее.

МикроРНК в норме и при нейропсихических заболеваниях

Предполагается, что микроРНК участвуют в регуляции экспрессии не менее 9%-30% белок-кодирующих генов генома человека. При этом, как правило, для каждой микроРНК можно предсказать множество мишеней, и напротив, многие гены несут потенциальные сайты распознавания для различных микроРНК. Регуляция экспрессии генов посредством микроРНК отличается высокой скоростью реагирования, обратимостью и возможностью локально изменять уровень мРНК-мишеней и белков в отдельных

компартаментах клетки, в отличие от регуляции, осуществляемой факторами транскрипции. Это крайне важно, например, для обеспечения синаптической пластичности нейронов.

МикроРНК играет важную роль в развитии нервной системы, функционировании синапсов и синаптической пластичности (см. обзор Kosik and Krichevsky, 2005; Bredy et al., 2011). Показано, что процесс нейрогенеза сопровождается изменением профиля продукции микроРНК. Важное значение микроРНК в клеточной дифференцировке и функционировании различных органов и физиологических систем в норме подразумевает, что сбои в работе микроРНК могут вести к нарушениям развития и болезням.

Этиология многих распространенных нейropsychических заболеваний, таких как нарушения развития нервной системы при аутизме и задержке умственного развития, возрастное снижение интеллекта и памяти при деменциях, не полностью прояснена, а в случае шизофрении и депрессии – вовсе не известна. Результаты исследований на модельных животных в сочетании с ныне доступными данными изучения патологий человека, указывают, что профили экспрессии микроРНК может быть важным и часто игнорируемым типом клеточных регуляторов, вовлеченных в функционирование мозга в норме и при патологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1. Базовые методы исследования микроРНК и их роли в развитии патологий человека. Анализ полиморфизмов в генах и хромосомных локусах с помощью ПЦР

Задачи данного раздела знакомят с тестированием полиморфных маркеров в геноме человека с использованием нескольких методов: ПЦР-ПДРФ и аллель-специфической ПЦР.

Схема эксперимента

Для генотипирования используют образцы ДНК человека, подготовленные преподавателем. Процедура анализа включает:

1. Проведение ПЦР
2. Обработку ПЦР-продуктов эндонуклеазами рестрикции
3. Электрофорез полученных продуктов рестрикции в агарозном или полиакриламидном гелях.
4. Определение размеров рестрикционных фрагментов и определение генотипов исследуемых локусов.

Проводят анализ генов, потенциально вовлеченных в развитие нервной системы и патогенез болезни Альцгеймера, например:

– 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 C → T, 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 (1, 2).

– Ген *MIR-9-2* кодирует микроРНК, экспрессирующуюся с высоким уровнем в головном мозге. Регулирует экспрессию ряда ключевых генов, вовлеченных в развитие болезни Альцгеймера, таких как *PSENI* и *BACE1* (Sempere et al., 2004; Tsitsiou and Lindsay, 2009; <http://www.targetscan.org>).

– Полиморфизм rs6656401 гена *CRI* по результатам полногеномного анализа ассоциаций показал высокий уровень значимости ассоциации с развитием болезни Альцгеймера (Lambert et al., 2009).

Задача 1. Определение аллельного полиморфизма в хромосомном локусе человека, содержащем ген *MIR9-2*

Цель задачи: определение генотипов образцов ДНК методом двунаправленной аллель-специфической ПЦР.

Определение аллельного полиморфизма в гене *MIR9-2* проводят методом двунаправленной аллель-специфичной ПЦР. Двунаправленная ПЦР позволяет получить в процессе амплификации каждого аллеля продукты различной длины, что дает возможность определения генотипа непосредственно после амплификации без дополнительного использования эндонуклеаз рестрикции. Принцип метода состоит в одновременном применении четырех праймеров, два из которых – внешние, расположены как в стандартной ПЦР на некотором

расстоянии от точки полиморфизма; два внутренних аллельспецифичных праймера лежат в противоположных направлениях и заканчиваются на варибельном нуклеотиде (рис. 2).

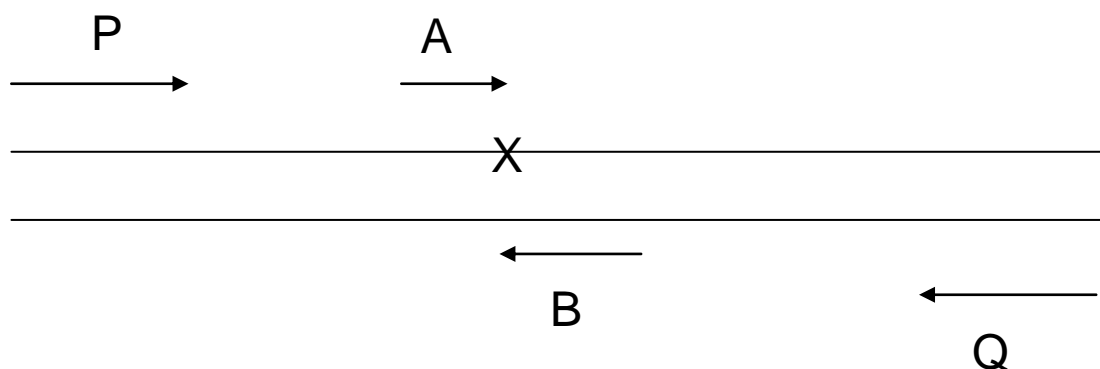


Рис. 2. Схема двунаправленной аллель-специфической ПЦР. Р и Q пара внешних праймеров, А и В — пара внутренних аллель-специфичных праймеров, имеющих на 3' конце нуклеотид, комплементарный соответствующему аллельному варианту. X — варибельный нуклеотид.

Ниже приводится фрагмент полиморфного локуса гена *MIR9-2* с указанием исследуемой однонуклеотидной замены:

АТАТGТАGАСТТGGGCAGTTCСТТТG[G/T]GAGGCACСТCCСТСТСААААТТТG

Для проведения аллель-специфической двунаправленной ПЦР используют высокоточную модифицированную Taq-полимеразу с «горячим стартом» (например, SNP-detect полимеразы, «ЗАО Евроген» или SNPasa, «Bioron.net»), разработанную специально для специфической амплификации фрагментов ДНК.

Проведение ПЦР

1. Перед проведением реакции подготовить все необходимые реагенты: буфер для полимеразы, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, каждый из праймеров, SNPdetect-полимеразу. Все реагенты, кроме полимеразы, разморозить при

комнатной температуре, перемешать коротким вортексированием, сбросить на центрифуге (1-2 тыс. об/мин в течение 5-10 секунд). Полимеразу размораживать не надо.

2. Промаркировать необходимое количество пробирок для ПЦР на 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого амплификатора) с учетом пробирки для отрицательного контроля (К-).
3. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество образцов, согласно Таблицы 1, добавляя реагенты в указанной последовательности.

Таблица 1. Приготовление реакционной смеси для ПЦР^{*)}

№	Компонент	Количество
1	Вода для ПЦР	12,7 мкл
2	Буфер для SNPdetect-полимеразы	2 мкл
3	Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов 10 мМ	2 мкл
4	Праймер 1, 10 мкМ	0,5 мкл
5	Праймер 2, 10 мкМ	0,5 мкл
6	Праймер 3, 10 мкМ	0,5 мкл
7	Праймер 4, 10 мкМ	0,5 мкл
8	SNPdetect-полимераза	0,3 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 95⁰С в течение 3 мин, 5 циклов: 94⁰С в течение 30 сек, 65⁰С в течение 1 мин и 72⁰С в течение 1 мин, далее 25 циклов: 94⁰С в течение 30 сек, 63⁰С в течение 30 сек и 72⁰С в течение 30 сек. Заключительная достройка концов фрагментов ДНК при 72⁰С в течение 3 мин.

Анализ продуктов амплификации

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

1. 30%-ный раствор акриламида (29 г акриламида и 1 г N,N'-метиленабисакриламида 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 +4-6⁰С.

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 *MIR9-2* согласно данным, представленным на рис. 3.

20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 М 30 31 32 33 34 35 36 37 38



Рис. 3. Результаты разделения фрагментов ДНК при анализе полиморфных вариантов маркера rs2304608 в гене *MIR9-2*. М – маркер молекулярного веса, размеры фрагментов снизу вверх соответствуют олигонуклеотидам размером 50, 100, 150 и т.д. до 500 п.н.

После проведения ПЦР полиморфного участка гена *MIR9-2* со всеми четырьмя праймерами с внешних праймеров образуется ПЦР-продукт размером 347 п.н., с помощью праймера, специфичного аллелю G образуется фрагмент размером 180 п.н., а с помощью праймера, специфичного аллелю T, образуется фрагмент размером 210 п.н. Использование высокоточной SNP-detect полимеразы позволяет минимизировать выход ПЦР-продукта, размером 347 п.н., в связи с чем на геле он, как правило, не выявляется, а наблюдаются только аллель-специфичные фрагменты. В случае, если после ПЦР образуется один фрагмент размером 180 п.н., что соответствует аллелю G, исследуемый образец ДНК является гомозиготой GG. В случае если после ПЦР образуется один фрагмент размером 210 п.н., что соответствует аллелю T, исследуемый образец ДНК является гомозиготой TT. В случае, если после ПЦР образуются два фрагмента, размером 180 и 210 п.н. исследуемый образец определяется как гетерозигота GT.

Исходя из вышеизложенного, результаты анализа, представленного на рисунке 4, следует интерпретировать следующим образом: образцы ДНК 24, 28, 29, 31, 34, 37 являются гомозиготами по аллелю G (генотип GG); образец ДНК 25 является гомозиготой по аллелю T (генотип TT); образцы ДНК 20, 21, 22, 23, 26, 27, 30, 32, 33, 35 являются гетерозиготами (генотип GT).

Задача 2. Определение аллельного полиморфизма в хромосомном локусе человека, содержащем ген *CRI*

1. Перед проведением реакции подготовить все необходимые реагенты из наборов для ПЦР (производитель фирма «IsoGene», Москва), каждый из праймеров. Дилуэнт 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 Таблицы 2, 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 2. Приготовление реакционной смеси для ПЦР^{*)}

№	Компонент	Количество
1	Вода для ПЦР	7 мкл
2	Дилуэнт	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 95⁰С в течение 4 мин, далее 30 циклов: 94⁰С в течение 30 сек, 57⁰С в течение 30 сек и 72⁰С в течение 30 сек. Заключительная достройка концов фрагментов ДНК при 72⁰С в течение 4 мин.

Рестрикционный анализ ПЦР-продуктов

1. Разморозить при комнатной температуре буфер для эндонуклеазы рестрикции *Hru99I*. 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 Таблицы 3, 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 3. Приготовление реакционной смеси для рестрикции *)

№	Компонент	Количество
1	Вода для ПЦР	6,5-Х мкл
2	Буфер для <i>Hru99I</i> , x10	1,5 мкл
3	Эндонуклеаза рестрикции <i>Hru99I</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 реакцию смесь.

**) Необходимый объем фермента рассчитывают в зависимости от активности *Hru99I*, указанной на упаковке в (ед.а./мкл).

4. Реакционную смесь перемешать и инкубировать при температуре 37°C в течении 1 часа.

Анализ продуктов рестрикции путем их визуализации в 2%-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 ТАЕ (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 ТАЕ (x1). Проконтролировать, чтобы буфер полностью покрывал агарозный гель и заполнил его лунки.

Проведение электрофореза в 2%-ном агарозном геле

1. По окончании рестрикции добавить к каждому образцу 2 мкл раствора для нанесения проб на гель.
2. Внести пробы в лунки геля. В отдельные лунки геля внести образец нерестрицированного ПЦР-продукта, образец ПЦР-продукта отрицательного контроля и ДНК-маркер молекулярного веса.
3. Провести электрофорез при 5-10В/см до тех пор, пока краситель не продвинется на 4-5 см.
4. Сфотографировать гель в коротковолновом УФ-свете с помощью лабораторной системы видеорегистрации гелей.
5. Определить размеры рестриционных фрагментов путем сравнения с размерами фрагментов ДНК-маркера молекулярных весов.
6. Определить генотипы образцов ДНК по исследуемому полиморфизму rs6656401 CR1 согласно данным, представленным на рис. 5.

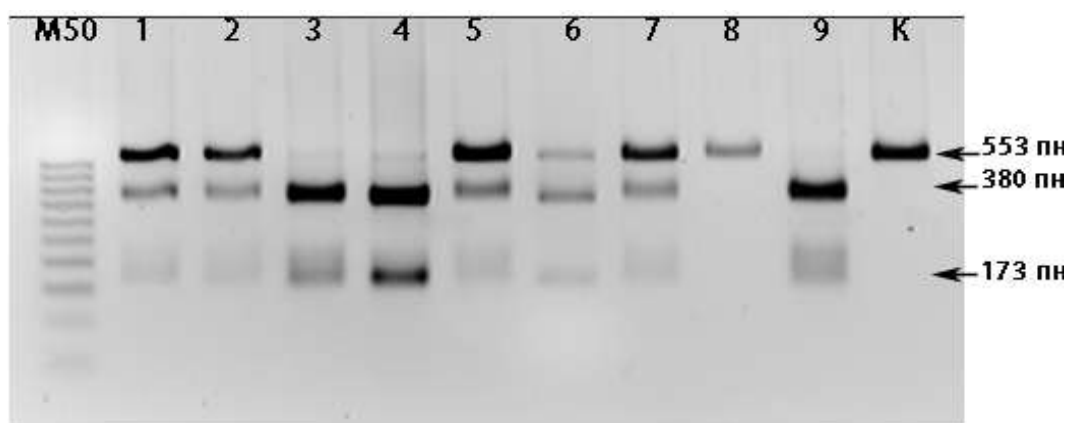


Рис. 5. Результаты разделения фрагментов ДНК при анализе полиморфных вариантов маркера rs6656401 гена CR1 в 2% агароном геле после гидролиза рестриктазой *Hpy99I*. M50 – маркер длины, K – контроль (ПЦР продукт). Дорожки 1, 2, 5, 6, 7 - образцы с генотипом AG, дорожки 3, 9 – GG, дорожка 8 – AA.

Как видно из рисунка 5, образец 8 не гидролизуется эндонуклеазой рестрикции *Hpy99I*, что свидетельствует о том, что этот образец ДНК содержит гомозиготные аллели AA (дорожка 8), Образцы 1, 2, 5, 6 и 7 являются гетерозиготами, т.е. несут аллель AA и аллель AG, поскольку подвергаются частичному гидролизу эндонуклеазой *Hpy99I*, в результате которого происходит образование продукта гидролиза размером 380 п.н. и выявляется негидролизированный продукт размером 553 п.н. (дорожки 1, 2, 5, 6, 7). Образцы 3, 4 и 9 содержат гомозиготные аллели GG, поскольку на электрофореграмме выявляются продукты полного гидролиза ПЦР-продукта размером 380 и 173 п.н.

Задача 3. Определение аллельного полиморфизма гена *APOE*

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

Определение полиморфных аллелей гена *APOE* ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$), кодирующих различные изоформы белка *APOE* (E2, E3 и E4) проводят с помощью метод ПЦР-ПДФ (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.

Проведение ПЦР и рестрикционный анализ

ПЦР и рестрикционный анализ локуса *APOE* проводят аналогично описанным в Задаче 2 с небольшими изменениями:

1. Для приготовления смеси для ПЦР использовать праймеры, фланкирующие полиморфные локусы гена *APOE*.

2. Программа амплификации локуса *APOE*: 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.

3. 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***

1. Электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле провести по протоколу, описанному в Задаче 1.
2. Определить генотипы образцов ДНК по исследуемому полиморфизму rs6656401 CR1 согласно данным, представленным на рис 6.

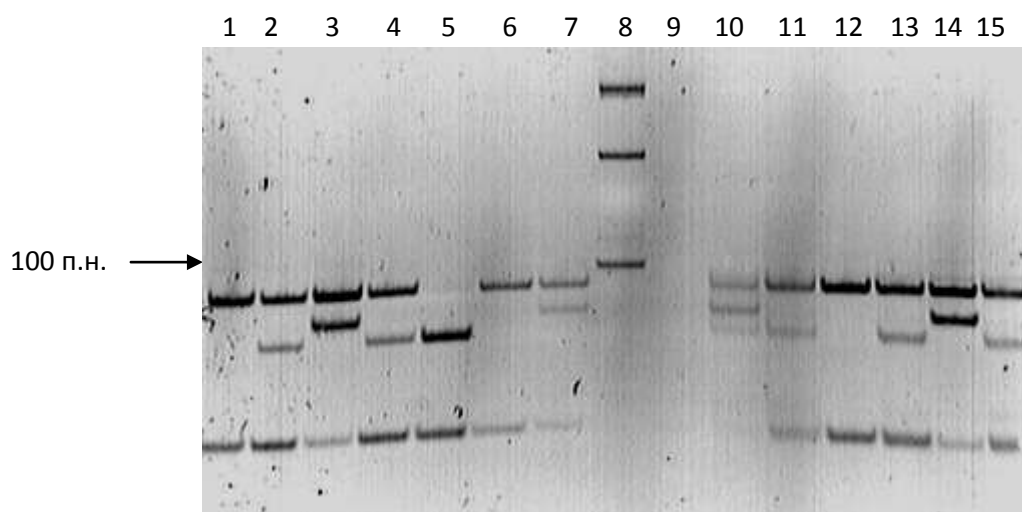


Рис. 6. Результаты разделения фрагментов ДНК при анализе полиморфных вариантов гена *APOE* в 8%-ном полиакриламидном геле после гидролиза рестриктазой *Bst*НН1. 8 – маркер молекулярных весов, 9 – отрицательный контрольный образец (К-). Дорожки 1, 6, 12 – образцы с генотипом $\epsilon 3\epsilon 3$; дорожки 2, 4, 11, 13, 15 – образцы с генотипом $\epsilon 3\epsilon 4$; дорожки 3, 7, 14 – образцы с генотипом $\epsilon 2\epsilon 3$; дорожка 5 – образец $\epsilon 4\epsilon 4$; дорожка 10 – образец с генотипом $\epsilon 2\epsilon 4$.

Задача 4. Анализ ассоциации полиморфизмов в локусах, кодирующих микро-РНК или в генах-мишенях микро-РНК

Цель задачи: оценить частоту встречаемости аллелей в исследуемой выборке, оценить соответствие распределения частот генотипов и аллелей равновесию Харди-Вайнберга и провести статистический анализ полученных данных.

Ход работы

На основе данных генотипирования полиморфных локусов в генах *mir-9-2* и *CR1*, а также предоставленной преподавателем информации о проанализированных образцах ДНК (пол, возраст, диагноз) определяются частоты генотипов и аллелей исследованных локусов и проводится сравнительный анализ частот в двух выборках. Каждый студент проводит сравнение различных групп (например, пациентов с болезнью Альцгеймера и контрольной группой здоровых индивидов; группу мужчин и женщин, группу молодых и пожилых индивидов).

1. Перед началом работы все генотипы, полученные при выполнении предыдущих задач, а также данные по полу,

возрасту, диагнозу для каждого образца вносятся в единую таблицу Excel и каждый студент получает копию сформированной таким образом базы данных.

2. Проводят оценку частот встречаемости генотипов и аллелей в каждой сравниваемой группе. На основе полученных данных заполняют таблицу, образец которой представлен ниже (табл. 4.).

Таблица 4. Образец таблицы для подсчета частот генотипов и аллелей.

Сравниваемая группа	Кол-во индивидов	Генотип (частота)			Аллель (частота)	
		GG	GT	TT	G	T
Группа 1						
Группа 2						

3. Используя данные, внесенные в таблицу, проводят их статистическую обработку с помощью программного пакета, размещенного на сайте <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. В качестве исходных данных используют наблюдаемое количество (не частоту) анализируемых генотипов.
4. На основе анализа статистических результатов делают вывод о соответствии (несоответствии) распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга, а также о наличии статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей между сравниваемыми группами.

Задача 5 (факультативная). Сравнительный анализ частот встречаемости генотипов и аллелей в исследованных выборках с данными, представленными в литературе

Цель задачи: Развитие навыков работы с литературными источниками.

Ход работы

1. С использованием баз данных NCBI, PubMed, AlzGene, SzGene проводят поиск полиморфных вариантов, которые были исследованы в задачах 1-2 и частот встречаемости их генотипов и аллелей в различных популяциях.
2. На основе имеющихся данных по частотам генотипов и аллелей полученных при выполнении задач 1-2 и выявленных в литературных источниках с помощью программного пакета, размещенного на сайте <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> проводят попарное сравнение различных популяций.
3. На основе анализа статистических результатов делают вывод о различиях (сходствах) частот встречаемости аллелей и генотипов в различных популяциях.

РАЗДЕЛ 2. Исследование РНК

Задачи данного раздела знакомят с методами выделения и анализа РНК.

Задача 6. Выделение РНК из образцов тканей животных

Цель задачи заключается в выделении РНК из замороженных тканей и ее анализ с помощью гель-электрофореза в агарозном геле.

Схема эксперимента:

Выделения тотальной РНК из биологического материала включает несколько этапов: первоначально проводят лизис клеток, затем обеспечивается депротеинизация клеточного лизата и далее проводят отделение фракции тотальной РНК от фракции геномной ДНК.

При работах с РНК следует учитывать, что РНК по сравнению с ДНК гораздо более лабильна и чувствительна к действию нуклеаз, а также тот факт, что РНКазы, в отличие от ДНКаз, менее чувствительны к действию препаратов денатурирующих белки. В связи с этим для выделения полноразмерных молекул РНК уже на первых этапах процедуры выделения тотальной РНК, одновременно с лизисом клеток, необходимо осуществить инактивацию внутриклеточных РНКаз. При этом известно, что молекулы РНК имеют небольшой размер, поэтому их механическая деградация при интенсивном перемешивании будет минимальной. Это позволяет интенсивно смешивать клеточные лизаты с ингибиторами РНКаз.

Для выделения РНК из образцов тканей существуют различные коммерческие наборы реагентов, позволяющие эффективно выделять РНК из различных источников.

Ход работы:

Выделение тотальной РНК

Выделение РНК проводят в стерильных условиях, предотвращающих контаминацию реактивов и образцов РНКазми. Перед началом работы все рабочие поверхности обрабатывают ингибиторами РНКаз, проводят УФ-облучение. Обязательно использование одноразовых перчаток для предотвращения РНКазной контаминации с поверхности рук и лабораторного оборудования.

1. Выделение РНК проводят строго по протоколу фирмы-производителя используемого набора реагентов для выделения РНК.
2. Для растворения (или элюции) выделенной РНК необходимо использовать только воду, обработанную DEPC (DEPC-treated water).
3. Выделенную РНК из-за ее крайней нестабильности следует хранить при температуре -70°C , избегать циклов замораживания-размораживания, и всю дальнейшую работу с ней проводить на льду.

Анализ выделенной РНК в агарозном геле

Для визуальной оценки препаратов РНК, выделенных из тканей животных проводят электрофоретическое разделение полученных образцов РНК в 1%-ном агарозном геле. При разделении в денатурирующих условиях интактная суммарная РНК эукариот имеет четкие и полосы, соответствующие 28S и 18S рРНК. Следует отметить, что полоса, соответствующая 28S рРНК, характеризуется свечением бромистого этидия приблизительно в два раза интенсивнее, чем полоса

соответствующая 18S рРНК. Подобное примерное соотношение 2:1 (28S:18S) является индикатором интактности РНК.

1. Приготовить 1%-ный агарозный гель, как описано в задаче 2, используя 1,25 г агарозы на 125 мл буфера ТАЕ х1.
2. Отобрать из пробирки с препаратом выделенной РНК 5 мкл и смешать их с 1 мкл раствора для нанесения проб на гель.
3. Внести пробы с раствором для нанесения в лунки геля.
4. В отдельную лунку внести маркер молекулярных размеров
5. Провести электрофорез при 5-10 В/см до тех пор, пока краситель не продвинется на 2-3 см.
6. Сфотографировать гель в коротковолновом УФ-свете.
7. Оценить размер полученных фрагментов РНК и их примерное соотношение между собой в соответствии с рисунком 7.

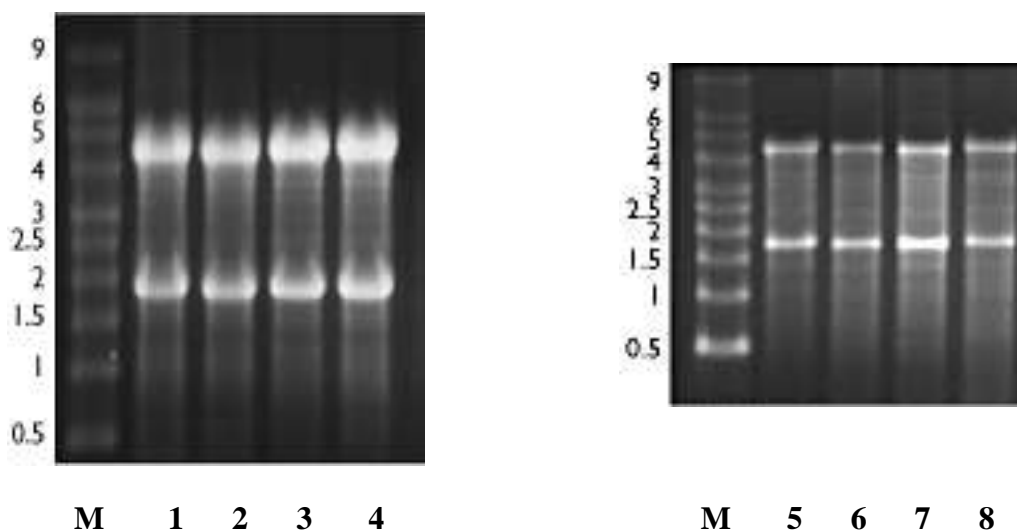


Рисунок 7. Пример электрофореграммы тотальной РНК, выделенной из образцов мозга. М - Маркер молекулярных весов «Millennium» («Ambion», США), 1-8 – образцы тотальной РНК из тканей мозга.

Как видно из представленных на рисунке 1 результатов, в образцах РНК отмечены мажорные фрагменты на уровне 4,8 т.п.н., который

представляет собой фракцию 28S РНК, и на уровне 1,8 т.п.н., который представляет собой фракцию 18S РНК. При этом у образцов, нанесенных на дорожки 1 – 4 сохраняется соотношение 2:1 между количеством 28S и 18S рРНК, а у образцов 5 – 8 соотношение изменено и составляет 1:2. Наличие минорных полос между мажорными фрагментами у образцов 1 – 4 свидетельствует о хорошем качестве выделенных образцов тотальной РНК.

Задача 7. Оценка качественных и количественных характеристик РНК

В настоящее время существует несколько методов для качественной и количественной оценки препаратов РНК.

Наиболее широко используемый метод – это визуальная оценка препаратов РНК с использованием метода разделения молекул РНК в агарозном геле в денатурирующих условиях. Разделение молекул РНК проводят в денатурирующих условиях в связи с особенностями вторичных структур молекул РНК – при разделении молекул РНК в нативных условиях затруднена интерпретация результатов, поскольку в этом случае молекулы РНК не разделяются в геле в соответствии с их размерами.

Для количественной оценки полученной РНК обычно используют спектрофотометрические методы, например, с использованием спектрофотометра «NanoDrop». Для оценки количества и чистоты препаратов РНК с использованием спектрофотометра «NanoDrop» требуется минимальный объем препарата РНК – около 1 мкл. Концентрация РНК определяется по оптической плотности препарата при длине волны 260 нм. Обычно одна единица оптической плотности при длине волны 260 нм соответствует концентрации 40 мкг/мл чистой

РНК. Одной из характеристик препаратов РНК является величина отношения оптической плотности при 260 и 280 нм – величина соотношения A260/A280 в диапазоне от 1.8–2.1 соответствует высокому качеству препарата РНК (характеризует степень очистки от образцов геномной ДНК).

Для более точной и детальной оценки препаратов РНК, а также количественного анализа с качественной оценкой применяют метод с использованием биоанализатора Agilent.2100.Bioanalyzer. В результате анализа с использованием данного прибора данные представляются в виде рисунка подобного разделению образцов в агарозном геле в денатурирующих условиях и в виде таблиц, содержащих основные качественные показатели исследуемого образца РНК.

Цель задачи: познакомиться с оборудованием для оценки качества и количества РНК.

Ход работы:

***Оценка количества РНК с помощью спектрофотометра
«NanoDrop»***

1. В программном пакете для спектрофотометра «NanoDrop» тип анализа – РНК.
2. Нанести 1 мкл воды, в которой растворены образцы анализируемой РНК, и провести измерение «Blank».
3. Протереть рабочую поверхность прибора сухой стерильной салфеткой.
4. Нанести 1 мкл исследуемого образца РНК, провести измерение.

Концентрация РНК и значения соотношений 260/280 и 260/230 определяются прибором автоматически (Рис. 8.). Соотношение оптической плотности при 260 и 280 нм в диапазоне от 1,8 до 2,1, свидетельствует о высокой степени очистки выделенного препарата РНК.

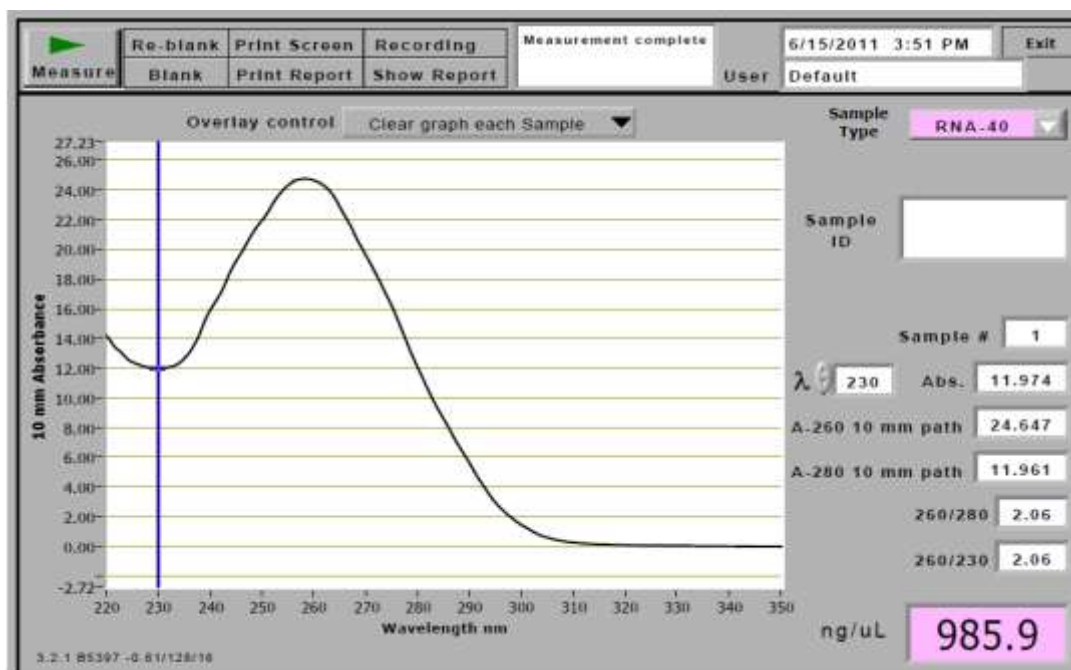


Рис. 8. Примеры определения концентрации и степени очистки выделенной РНК на спектрофотометре («NanoDrop») при длинах волн 260, 280, 320 нм.

Задача 8 (факультативная). Оценка количества и качества РНК с помощью биоанализатора Agilent.2100.Bioanalyzer

(подготовка прибора к работе и измерения проводятся преподавателем)

Важным показателем качества РНК является интегральный показатель сохранности РНК (RIN - RNA Integrity Number). Выделяют три класса RIN - высокая степень сохранности РНК – значение RIN должно быть близко 10; частично деградированная РНК – значение RIN

– до 5; полностью деградированная РНК характеризуется значением RIN около 3.

На рис. 9 приведены примеры анализа образцов РНК с помощью биоанализатора, а ниже – их интерпретация.

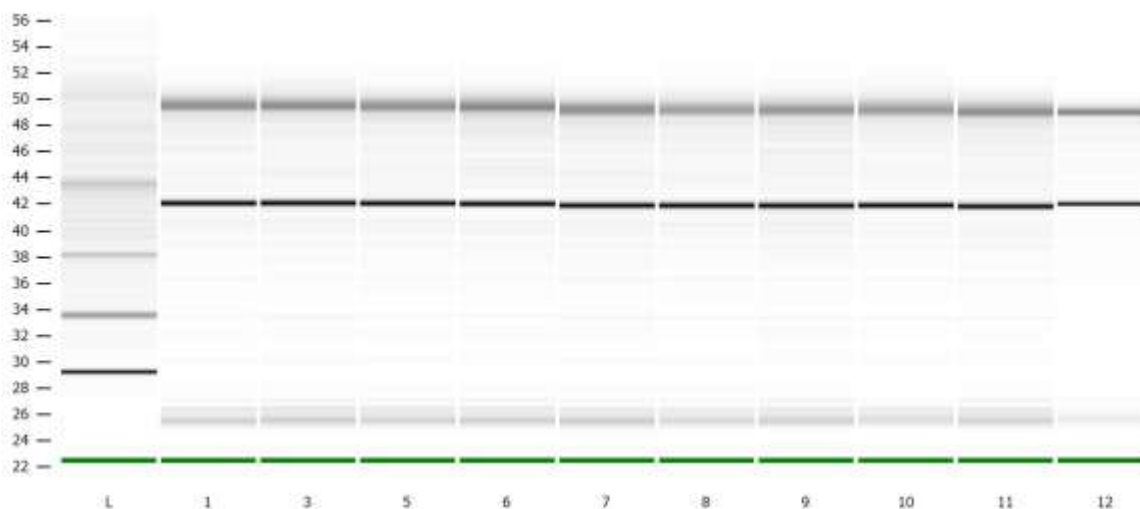


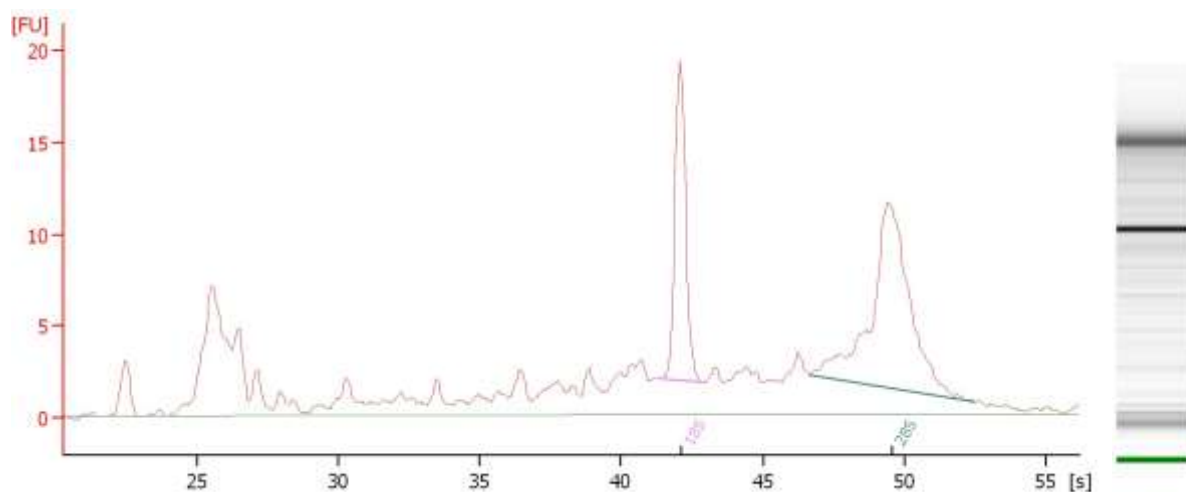
Рис. 9. Пример разделения препаратов РНК в геле, полученный с использованием биоанализатора Agilent.2100.Bioanalyzer («Agilent», США). L – маркер молекулярного размера, 1 – 12 – индивидуальные образцы РНК.

При анализе образцов РНК с использованием биоанализатора Agilent.2100.Bioanalyzer получаемые результаты имитируют электрофоретическое разделение. Мажорные полосы в области 49 и 42 соответствуют 28S и 18S рРНК, соответственно.

Анализ полос, соответствующих индивидуальному образцу РНК и маркеру молекулярного размера, проводится автоматически. В результате анализа генерируется профиль, и рассчитываются количественные и качественные характеристики образца РНК: концентрация РНК, соотношение между 28S и 18S рРНК и индекс сохранности РНК (RIN).

На рисунках 10-11 представлены пример профиля нескольких образцов РНК, выделенных из ткани лабораторных животных.

Согласно полученным результатам, концентрация РНК, анализ которой представлен на рис. 10 составляет 190 нг/мкл; соотношение содержания 28S и 18S составляет 1,7, а индекс сохранности РНК – 7,3. Данные количественные показатели и качественная оценка свидетельствуют о том, что данный образец РНК характеризуется достаточным для дальнейшего анализа количеством и высокой степенью сохранности.



RNA Area: 181.7

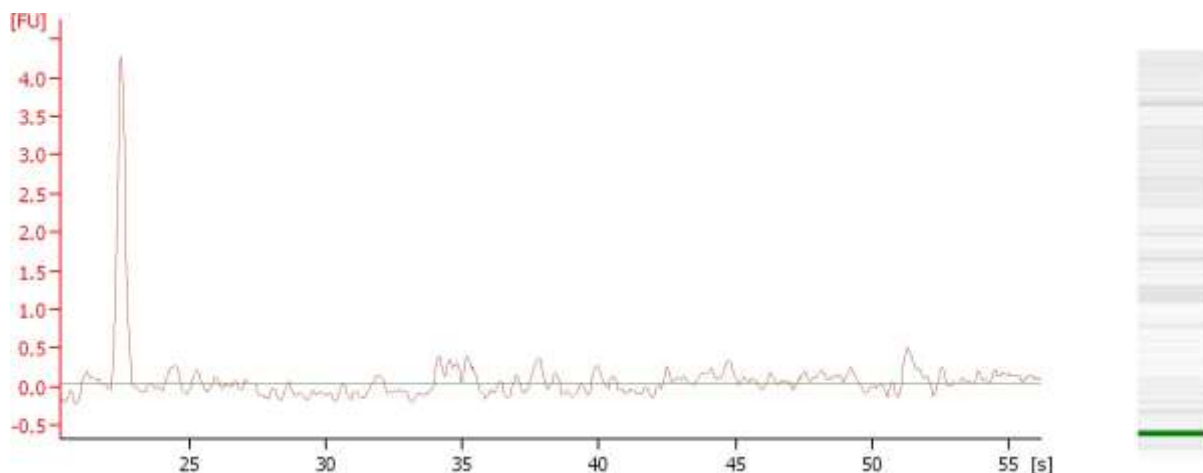
RNA Concentration: 190 ng/ μ l

rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7

RNA Integrity Number (RIN): 7.3

Рис 10. Профиль образца РНК, полученный с использованием биоанализатора Agilent.2100.Bioanalyzer («Agilent», США) и его количественные и качественные характеристики.

Согласно данным, представленным на рисунке 11, концентрация исследуемого образца РНК составляет 8 нг/мкл; соотношение содержания 28S и 18S составляет 0, и индекс сохранности РНК – не определен. Подобные количественные показатели и качественная оценка свидетельствуют о том, что данный образец РНК характеризуется очень низкой концентрацией РНК и степенью сохранности, и, как следствие, не может быть использован для дальнейшего анализа.



RNA Area: 7.2

RNA Concentration: 8 ng/μl

rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.0

RNA Integrity Number (RIN): N/A

Рис. 11. Профиль образца РНК, полученный с использованием биоанализатора Agilent.2100.Bioanalyzer («Agilent», США) и его количественные и качественные характеристики.

Задача 9. Синтез первой цепи кДНК

Цель задачи: Познакомиться с методикой получения первой цепи кДНК из матрицы РНК.

Синтез первой цепи кДНК (обратная транскрипция или ОТ) проводится с использованием рекомбинантной обратной транскриптазы являющейся продуктом гена *pol* вируса лейкоза мышей Молони (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MLV). Обратная транскриптаза M-MLV является РНК-зависимой ДНК полимеразой, обладающая как РНК-, так и ДНК-полимеразной активностью, и может быть использована для синтеза комплементарной цепи ДНК (кДНК) длиной свыше 5 т.п.о. В качестве праймеров в данной задаче используются случайные гексонуклеотиды (random), которые неспецифически связываются на мРНК, нарабатывая небольшие (короткие) перекрывающиеся кДНК практически по всей матрице мРНК. Эти

праймеры идеально подходят для преодоления сложных участков с вторичной структурой матрицы. Ими можно эффективно транскрибировать 5' район мРНК и изучать всю последовательность мРНК.

Ход работы

Для работы используют образцы РНК, выделенные из тканей человека или клеточных линий. Образцы РНК подготавливаются преподавателем.

1. В пробирке, помещенной в лед, смешать компоненты в соответствии с таблицей 5. Для работы использовать набор реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (фирма «Applied Biosystems») или аналогичный.

Таблица 5. Приготовление реакционной смеси для синтеза 1-й цепи кДНК*)

№	Компонент	Количество
1	Вода свободная от РНКаз	1,2 мкл
	Буфер для обратной транскриптазы x10	1 мкл
	25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 мкл
	MMLV обратная транскриптаза	1 мкл
2	РНК	5 мкл
3	Праймер – случайный гексамер, 100 мкМ	1 мкл

*)Условия реакции и состав реакционной смеси могут различаться в наборах для обратной транскрипции разных фирм-производителей.

2. Перемешать, осадить капли кратковременным центрифугированием.
3. Инкубировать смесь 10 мин при 25°C, 120 мин 37°C, 5 мин при 85°C. Перенести пробирку в лед и после охлаждения вновь собрать капли кратковременным центрифугированием.

Образцы синтезированной первой цепи кДНК необходимо хранить при температуре $-20\dots-70^{\circ}\text{C}$, избегать циклов замораживания-размораживания, и всю дальнейшую работу с ней проводить на льду. Синтезированную кДНК можно использовать в качестве матрицы для дальнейших исследований, например для оценки уровня экспрессии генов методом полуколичественного анализа.

Задача 10. Полуколичественный анализ РНК

Цель задачи: Познакомиться с методом полуколичественного анализа РНК и проведением ПЦР на матрице кДНК

В данной задаче могут быть использованы олигонуклеотидные праймеры комплементарные кодирующим участкам генов, вовлеченных в патогенез болезни Альцгеймера (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *BACE1*). В результате реакции синтеза кДНК на матрице РНК с использованием случайных праймеров образуется набор фрагментов ДНК, комплементарных транскрибируемому (кодируемому) участкам всех генов. Таким образом, при использовании праймеров, комплементарных кодирующим участкам целевых генов, в результате ПЦР образуются фрагменты ДНК, соответствующие только экзонным участкам генов, т.к. интронные последовательности в РНК, использованной для синтеза кДНК не присутствуют. В тоже время в связи с отсутствием интронных последовательностей в кДНК в случае, если используемые праймеры комплементарны интронным участкам, ПЦР-продукт не образуется.

В качестве дополнительного контроля реакции амплификации для анализа РНК при постановке ПЦР используют образец геномной ДНК. Результат амплификации которого позволяет оценить возможность

отжига праймеров не только на кДНК, не содержащую интронных участков, но и на геномную ДНК,

Проведение ПЦР на матрице кДНК

ПЦР на матрице кДНК проводят аналогично описанной в Задаче 2 с небольшими изменениями:

1. Для приготовления смеси для ПЦР использовать праймеры для анализа соответствующего гена (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *BACE1*).

2. Вместо ДНК в реакционную смесь вносить кДНК, синтезированную на матрице РНК.

3. Помимо отрицательного контроля реакции с каждой парой олигонуклеотидных праймеров (К-), необходимо поставить контрольный образец, в который в качестве матрицы внесена геномная ДНК.

4. Поставить дополнительные реакции с праймерами, комплементарными одному из экзонов гена АРОЕ.

5. Установить программу амплификации: первоначальная денатурация при 95⁰С в течение 4 мин, 30 циклов: 94⁰С в течение 30 сек, 57⁰С в течение 30 сек и 72⁰С в течение 30 сек. Заключительная достройка концов фрагментов ДНК при 72⁰С в течение 4 мин.

Анализ продуктов амплификации

1. Электрофорез в 2%-ном агарозном геле проводить по схеме, описанной в Задаче 1.
2. Определить размеры полученных ПЦР-фрагментов путем сравнения с размерами фрагментов ДНК-маркера молекулярных весов.
3. Оценить интенсивность фрагментов, соответствующих каждому гену и по интенсивности сделать вывод об относительном уровне экспрессии соответствующего гена в исследуемом образце РНК (Рис. 12).

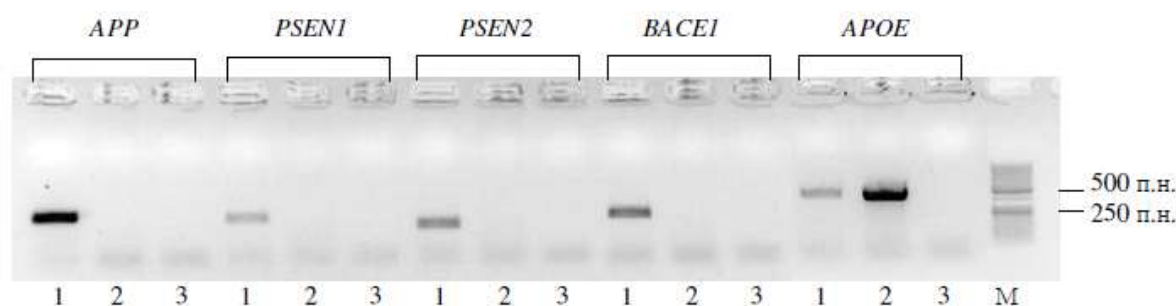


Рис. 12. Результаты разделения фрагментов ДНК, полученных в результате ПЦР-амплификации кДНК с праймерами, комплементарными генам *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *BACE1*, *APOE*. М – маркер молекулярного веса. 1 – кДНК, 2 – геномная ДНК, 3 – К-.

На рисунке 12 представлены результаты амплификации кДНК, полученной на матрице РНК, выделенной из клеточной линии человека НЕК293. Прямой и обратный олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации генов *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *BACE1*, комплементарны участкам ДНК, расположенным в разных экзонах соответствующих генов, таким образом, при использовании в ПЦР в качестве матрицы геномной ДНК ПЦР-продукт не образуется (дорожки обозначенные номером 2). В то же время при использовании в ПЦР в качестве матрицы кДНК, полученной на основе РНК, не содержащей

эксонные последовательности, образуются ПЦР-продукты соответствующего размера. По интенсивности фрагментов можно сделать предварительный вывод о том, что в исследуемой клеточной линии наибольший уровень экспрессии наблюдается для гена *APP*, тогда как ген *PSENI* экспрессируется слабее всех.

Особое внимание следует обратить на контрольную ПЦР-реакцию, проводимую с использованием прямого и обратного праймера, комплементарного одному и тому же экзону гена *APOE*. Как можно видеть на рис. 12, ПЦР-продукт, соответствующий гену *APOE*, присутствует как в образце кДНК, так и в образце геномной ДНК, что и следовало ожидать при использовании подобного рода олигонуклеотидных праймеров.

ЛИТЕРАТУРА

- Андреева Т.В., Гольцов А. Ю., Голенкина С. А., и др. (2011). Ассоциация полиморфизма в гене CR1 с болезнью Альцгеймера в российской популяции. *Психиатрия*. № 5.
- Голенкина, С. А., А. Ю. Гольцов, И. Кузнецова и др.. (2010). Анализ общего полиморфизма в гене кластерина (CLU/APOJ) в российских популяциях и при болезни Альцгеймера. *Молекулярная биология*. 44, 620-626.
- Рогаев Е.И., Боринская С.А., Исламгулов Д.В., Григоренко А.П. (2008) МикроРНК человека в норме и патологии. *Молекулярная биология*, 42, 751-764.
- Bredy, T.W., Lin, Q., Wei, W., et al. (2011). MicroRNA regulation of neural plasticity and memory. *Neurobiol Learn Mem* 96, 89-94.
- Kosik, K.S., Krichevsky, A.M. (2005). The elegance of the microRNAs: a neuronal perspective. *Neuron* 47, 779–782.
- Lambert J.C. et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41, 1094.
- Orom, U.A., Nielsen, F.C. & Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'-UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell* 30, 460–471.
- Sayi J.G. (1997). Apolipoprotein E polymorphism in elderly east Africans. The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics / J.G. Sayi, N.B. Patel, D.R. Premkumar // *East Afr. Med. J.* 74, 668-670.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5, R13.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B. & Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455, 1124–1128.
- Tang M.X. (1998). The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics / M.X. Tang, Y. Stern, K. Marder // *JAMA*. 279, 751-755.
- Tsitsiou, E., Lindsay, M.A.. (2009). microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol* 9, 514-520.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ И РАЗМЕРЫ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ПЦР-ПРОДУКТОВ

Номер задачи	Ген	Последовательность праймера	Размер ПЦР-продукта, п.н.
Задача 1	<i>MIR-9-2</i>	TCTTGAGAGGGGTTGTTGCAG	180, 210
		TTGCCTGCTAGCTCTAAGTCCTCA	
		TGTAGACTTGGGCAGTTCSTTTGG	
		TTTGAGAGGGGAGGTGCCTCA	
Задача 2	<i>CRI</i>	AAAATGTTACATATGCACTTGAATG	553
		CCTGATCTCTGAAACCTGTGAA	
Задача 3	<i>APOE</i>	CGGCTGGGCGCGGACATGGAGGA	
		TCGCGGGCCCCGGCCTGGTACAC	
Задача 10	<i>PSEN1</i> , кДНК	TCATGCTCTTTGTCCCTGTG	333
		GCCAGGCATGGATGACCTTA	
	<i>PSEN2</i> , кДНК	ACCCTGACCGCTATGTCTGT	192
		GCGTGTAGATGAGCTGTCCA	
	<i>APP</i> , кДНК	GGAAGTGGGATTCAGATCCA	290
		AGTTTCGCAAACATCCATCC	
	<i>BACE1</i> , кДНК	AGGTATCGACCACTCGCTGT	269
		GCTGCTCTCCTAGCCAGAAA	
<i>APOE</i>	TCATGCTCTTTGTCCCTGTG	370	
	GCCAGGCATGGATGACCTTA		