

УДК 577.215:616-006.6:571.27

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ мРНК АЛЬФА-ЦЕПИ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2010 г.

С.В. Новикова¹, А.В. Алясова², Д.В. Новиков¹

¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

² Нижегородская государственная медицинская академия

mar_mot@list.ru

Поступила в редакцию 01.04.2010

Разработан метод детекции двух форм матричной РНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в клетках опухолевых очагов человека. Показано, что мРНК классической формы и формы с делецией 4 экзона выявляются в образцах клеток опухолевых очагов больных колоректальным раком в 92% случаев (47 больных из 51).

Ключевые слова: альфа-цепь рецептора интерлейкина-2, CD25 антиген, колоректальный рак.

Введение

Интерлейкин-2 (IL-2) является цитокином, активирующим лимфоциты при связывании с соответствующим рецептором на их мембране. В состав данного рецептора входят три субъединицы, одна из которых необходима для высокоаффинного связывания IL-2 – это альфа-цепь рецептора интерлейкина-2 (IL-2RA, CD25 антиген). Роль IL-2RA в механизмах активации и супрессии клеточного иммунного ответа хорошо известна. Рецептор интерлейкина-2 обнаружен также на злокачественно трансформированных клетках крови и на клетках солидных опухолей, включая рак толстого кишечника. Обнаружено, что система IL-2RA-IL-2 участвует в механизмах пролиферации неопластических клеток, а высокий уровень экспрессии CD25 антигена на поверхности опухолевых клеток коррелирует с плохим прогнозом для пациента [1]. Показано, что в клетках наряду с мРНК, кодирующей полноразмерную форму CD25 антигена, может присутствовать альтернативная форма мРНК CD25 антигена с делецией 4-го экзона, ответственного за связывание IL-2 (CD25Exo4Del) [2]. Целью работы явилось создание метода одновременной детекции полноразмерной и альтернативной форм мРНК CD25 антигена в клетках опухолевых очагов.

Материалы и методы

Материалом для работы явились 51 образец клеток опухолевых очагов больных колоректальным раком, полученных из Нижегородской областной клинической больницы им. Н.А. Се-

машко от больных в момент резекции опухоли, и 10 образцов периферической крови здоровых волонтеров. Выделение мРНК из клеток проводили с использованием фенол-хлороформенной экстракции.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием праймера CD25-R1, разработанного авторами, и обратной транскриптазы M-MuLV («Promega», USA). После реакции обратной транскрипции пробу разводили в 50 мкл воды, свободной от нуклеаз. 2 мкл полученной смеси использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве стандартных параметров ПЦР были приняты следующие условия. Первоначальный прогрев смеси проводили 1 мин при 94°C, денатурацию ДНК – 30 сек при 94°C, элонгацию – 45 сек при 72°C, окончательную достройку цепей – 5 мин при 72°C. Количество циклов для первого раунда ПЦР составило 40, для второго – 30. Результаты ОТ-ПЦР оценивали методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле.

Для определения нуклеотидной последовательности фрагменты кДНК вырезали из агарозного геля с последующей элюцией с использованием набора DNA Extraction Kit («Fermentas», Латвия) согласно рекомендациям производителя. Реакцию терминирования дидезокси-нуклеозидтрифосфатами, мечеными флюоресцентными красителями, проводили с использованием набора BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems», USA). К 5 мкл ДНК добавляли 1 мкл BigDye Terminator, 2 мкл буфера и 0.5 мкл праймера, инкубировали при 94°C в течение 5 мин и проводили 25 цик-

Таблица

Количество полос на электрофореграмме кДНК гена IL-2RA в зависимости от параметров ПЦР

Температура отжига праймеров, °С	Время отжига праймеров, сек	Концентрация ионов Mg ²⁺ , мМ			
		1.5	2.0	2.5	3.0
50	10	3	1	1	1
	30	1	1	1	1
55	10	1	1	1	1
	30	1	1	1	1
60	10	1	1	1 </td <td>1</td>	1
	30	1	1	1	1



Рис. 1. Схема посадки праймеров для синтеза и амплификации кДНК CD25 антигена. НТР – нетранслируемый регион; LP – регион лидерного пептида; TM – регион трансмембранного домена; CP – регион цитоплазматического домена; poly A – полиадениловый трек; CD25-Exo1/2, CD25-Exo2/3, CD25-R1, CD25-R2 – названия праймеров. 1–8 – номера экзонов

лов ПЦР по следующей программе: 94°C – 10 сек, 50° – 10 сек, 62° – 4 мин. Реакционную смесь переосаждали изопропанолом, разводили в 20 мкл деионизованного формамида и прогревали при 94°C в течение 5 мин. Затем проводили анализ первичной нуклеотидной последовательности одноцепочечной ДНК с использованием генетического анализатора ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», USA).

Результаты и их обсуждение

Для разработки метода детекции мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в клетках опухолевых очагов человека с использованием гнездового варианта ОТ-ПЦР были сконструированы две пары праймеров. Подбор праймеров осуществляли на основе полноразмерной кодирующей последовательности, соответствующей мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 клеток крови человека. Данная последовательность представлена в базе данных EMBL/GenBank на портале NCBI в разделе «nucleotide» под регистрационным номером NG_007403.1 GI:167860094. Первый прямой праймер (CD25-Exo1/2 5'-CTGGGTGCCAGGCAGAGCTC-3') и второй прямой праймер (CD25-Exo2/3 5'-AATGCACAAGCTCTGCCACT-3') комплементарны последовательностям, соответствующим местам соединения 1–2 и 2–3 экзонов мРНК CD25

антигена соответственно. Такая посадка праймеров позволяет исключить амплификацию последовательности гена альфа-цепи рецептора интерлейкина-2. Первый обратный праймер (CD25-R1 5'-GCTACCTTAGATCTGTTGTAATAATGGACG-3') и второй обратный праймер (CD25-R2 5'-GTCTCCATGGTTGCAGCCAT-3') комплементарны последовательностям экзона 6. Схема, иллюстрирующая расположение мест посадки подобранных праймеров на матрице мРНК CD25 антигена, представлена на рис. 1. Сконструированные праймеры использовали для подбора оптимальных условий ОТ-ПЦР для синтеза и амплификации кДНК гена альфа-цепи рецептора интерлейкина-2, тестируя систему с использованием суммарной РНК, выделенной из клеток периферической крови здоровых добровольцев.

С целью повышения чувствительности и специфичности реакции применяли гнездовой вариант ПЦР. В первом раунде использовали праймеры CD25-R2 и CD25-Exo1/2, во втором раунде – CD25-R2 и CD25-Exo2/3. Для эффективной амплификации фрагментов точные значения оптимальной температуры и времени отжига праймеров, а также концентрацию ионов Mg²⁺ в буфере для полимеразы подбирали эмпирически в ряде экспериментов при неизменных стандартных параметрах реакции, представленных в разделе «Материалы и методы». Результаты подбора параметров реакции представлены в таблице.

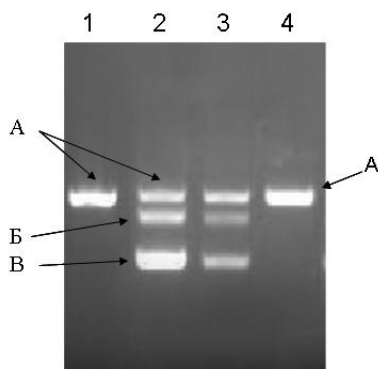


Рис. 2. Электрофореграмма кДНК гена IL-2RA человека. 1, 2 – кДНК гена IL-2RA, синтезированные на матрице мРНК, выделенной из клеток периферической крови человека; 3, 4 – кДНК гена IL-2RA, синтезированные на матрице мРНК, выделенной из клеток опухолевых очагов больных раком толстого кишечника; А – кДНК, синтезированная на матрице полноразмерной формы мРНК CD25 антигена; Б – продукт неспецифической амплификации; В – кДНК, синтезированная на матрице альтернативной CD25Exo4Del формы мРНК CD25 антигена

Оптимизация условий реакции ОТ-ПЦР на матрице РНК, выделенной из клеток периферической крови человека, позволила получить несколько продуктов амплификации – фрагментов кДНК, представленных в виде электрофореграмм на рис. 2 (треки 1 и 2).

При определении нуклеотидной последовательности полученных фрагментов кДНК А, Б и В было установлено, что в результате ОТ-ПЦР с описанным выше набором праймеров в клетках периферической крови человека при всех опробованных вариантах параметров реакции обнаруживаются кДНК, кодирующая полноразмерную форму CD25 антигена (фрагмент А). Только при одном сочетании условий проведения реакции обнаруживаются два вида кДНК гена IL-2RA: кДНК, кодирующая полноразмерный CD25 антиген (фрагмент А) и кДНК, кодирующая его альтернативную форму CD25Exo4Del (фрагмент В). Фрагмент Б является продуктом неспецифической амплификации. Оптимальными для амплификации кДНК гена IL-2RA явились следующие условия: температура отжига праймеров – 50°C, время отжига праймеров – 10 секунд, концентрация ионов Mg²⁺ в буфере для полимеразы – 1.5 мМоль.

Для выявления мРНК IL-2RA использовали реакционную смесь следующего состава: 2.5 мкл 10X буферного раствора, содержащего 1.5 мМоль ацетата Mg, 2 мкл смеси 4-х дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, по 0.5 мкл прямого и обратного праймеров, 0.5 мкл Taq-полимеразы (10 единиц активности/1 мкл), 17 мкл бидистиллированной воды, свободной от нуклеаз, 2 мкл раствора, содержащего кДНК. Реакционную смесь, покрытую минеральным маслом, инкубировали в амплификаторе по программе для первого раунда ПЦР: 94°C – 2 мин, (94°C – 30 сек, 50°C – 10 сек, 72°C – 45 сек) – 40 циклов, 72°C – 5 мин. После окончания первого раунда ПЦР 2 мкл амплифицированной кДНК переносили в пробирки с 23 мкл реакционной смеси для второго раунда ПЦР. Покрытую минеральным маслом реакционную смесь инкубировали в амплификаторе по программе для второго раунда ПЦР: 94°C – 1 мин, (94°C – 30 сек, 50°C – 10 сек, 72°C – 45 сек) – 30 циклов, 72°C – 5 мин.

Тестирование образцов опухолевых очагов на присутствие мРНК CD25 антигена с использованием разработанного метода показало, что совместное присутствие полноразмерной и альтернативной (CD25Exo4Del) форм мРНК CD25 антигена в клетках опухолевых очагов больных колоректальным раком регистрируется в 92% случаев (47 из 51). В двух исследованных образцах была выявлена только полноразмерная форма мРНК CD25 антигена (рис. 2, трек 4). В двух образцах не обнаружена ни одна форма мРНК CD25 антигена.

Таким образом, в результате проделанной работы сконструированы праймеры и подобраны оптимальные условия ОТ-ПЦР для детекции двух форм мРНК CD25 антигена в клетках опухолевых очагов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

Список литературы

1. Kuhn D, Dou Q. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer // *Front Biosci*. 2005. № 10. P. 1462–1474.
2. Cosman D. Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor // *Nature*. 1984. V. 312. № 5996. P. 768–771.

DEVELOPMENT AND TESTING OF THE METHOD FOR DETECTING HUMAN INTERLEUKIN-2 RECEPTOR ALPHA CHAIN mRNA IN TUMOR CELLS

S.V. Novikova, A.V. Alyasova, D.V. Novikov

A method to detect 2 forms of human interleukin-2 receptor alpha-chain mRNA in tumor cells has been developed. It is shown that the classical form mRNA and the form with the 4th exon deletion are present in tumor cells of colorectal cancer patients in 92% of cases (in 47 patients out of 51).

Keywords: interleukin-2 receptor alpha chain, CD25 antigen, colorectal cancer.