

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ПРОКАРИОТ

Минаев М.Ю.,* Махова А.А.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Ключевые слова: экспрессия генов, прокариоты, ПЦР, количественный анализ**Аннотация**

Количественная полимеразная цепная реакция (qПЦР) в реальном времени — один из методов оценки уровня экспрессии генов. Интерес к изучению молекулярных механизмов экспрессии генов и ее оценки в прокариотической клетке обусловлен недостатком исследований по данному вопросу и рядом методологических проблем. В работе представлено изучение механизма экспрессии генов у прокариот на примере генов гиразы B и коллагеназы *Aeromonas salmonicida* ASI. В результате проведенных исследований были протестированы применяемые в реакции обратной транскрипции случайный (Random) и праймер oligo (dT) с «якорем» (два крайних нуклеотида праймера по 3' концу, комплементарные нуклеотидам стоп-кодона транскрибируемой последовательности ДНК) и адаптером собственной разработки. Применение oligo (dT) праймера стало возможным только после полиаденирования выделенной РНК с помощью специального набора с поли — А полимеразой. Установлено, что разработанный нами протокол проведения обратной транскрипции (ОТ) с использованием oligo (dT) праймера и определенной последовательностью адаптера на его 5' конце, предназначенного для дальнейшего отжига реверс-праймера при проведении ПЦР в реальном времени наряду с предварительным полиаденированием РНК исключает специфическую амплификацию остаточной фоновой геномной ДНК. Данная методика может найти применение в оценке уровня экспрессии низкоэкспрессионных генов при высоком содержании примеси фоновой геномной ДНК в образце РНК, например, на конечной стадии логарифмического роста прокариотической клетки.

Original scientific paper

THE STUDY OF PROKARYOTIC GENE EXPRESSION

Mihail Yu. Minaev,* Anzhelika A. Makhova

V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Key words: gene expression, prokaryotes, PCR, assay**Abstract**

One of the methods to evaluate the level of gene expression is a real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Interest in the study of molecular mechanisms of gene expression and its evaluation in prokaryotes is due to the lack of research on this issue and a number of methodological problems. The paper presents a study of gene expression mechanism in prokaryotes evidence from *Aeromonas salmonicida* ASI gyrase B and collagenase genes. As a result of the research, Random primer and oligo (dT) primer (two 3'-terminal nucleotides of the primer complementary to stop codon nucleotides of the transcribed DNA sequence) with anchor and adapter of our own design were tested, which are used in the reaction of reverse transcription. The use of oligo (dT) primer became possible only after polyadenylation of extracted RNA using special poly-A polymerase kit. It is determined that the developed protocol of reverse transcription (RT) using oligo (dT) primer and adapter with certain sequence on its 5'-terminus designed for further annealing of the reverse primer during real-time PCR along with preliminary polyadenylation of RNA excludes specific amplification of the background genomic DNA. This technique may be applied in evaluating the expression level of low-expression genes when high background genomic DNA content is found in the RNA sample, e.g. at the end of logarithmic growth of prokaryotic cells.

Введение

Клетки любого организма, какие бы функции они ни выполняли, имеют полный набор свойственных данному организму генов. У любого организма клетки разных тканей и органов отличаются по различным признакам и набору имеющихся в них белков. Даже в одной клетке на разных стадиях ее развития синтезируются и функционируют разные белки. Однако, в любой клетке имеется определенный набор генов, обеспечивающих поддержание важнейших жизненных функций организма,

которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Эти гены получили определение «гены домашнего хозяйства», они функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма. В методологии изучения экспрессии генов гены домашнего хозяйства используются в качестве генов выравнивания, относительно которых изучается экспрессия целевых генов.

Располагая полной генетической информацией, каждая клетка на определенном этапе развития ис-

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Минаев М.Ю., Махова А.А. Изучение экспрессии генов у прокариот. Теория и практика переработки мяса. 2018; 3(2): 40–52. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-40-52

FOR CITATION: Minaev M. Yu., Makhova A.A. The study of prokaryotic gene expression. Theory and practice of meat processing. 2018; 3(2): 40–52. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-2-40-52

пользует лишь ту ее часть, которая необходима в настоящий момент, транскрибируются только те гены, продукты которых нужны клетке в непосредственный момент ее существования для осуществления ее функций. Клетка должна располагать механизмами, определяющими, какие гены и в какой последовательности должны экспрессироваться («выражаться», то есть давать продукт — РНК или белок), а какие подавляться. При этом мРНК генов, экспрессия которых подавляется быстро, деградирует в клеточном матриксе в отличие от, например, ДНК отмерших клеток.

Постоянное изменение экспрессии тех или иных генов проявляется в первую очередь на уровне транскрипции. Это сказывается на изменении количества молекул РНК, прежде всего, м-РНК.

Поэтому количественный анализ экспрессии генов сводится к анализу транскриптома, измерению транскрипционной активности гена, с помощью определения количества его продукта, матричной РНК (мРНК), универсальной для большей части генов. При этом конечный продукт экспрессии генов как правило белки, а не мРНК.

Для измерения количества мРНК разработаны следующие методы: количественная ПЦР в реальном времени (qPCR), применяется для анализа уровня экспрессии нескольких генов; сравнительная геномная гибридизация на чипах (CGH), позволяет видеть количественные изменения экспрессии генов прямо на хромосомах; микрочипы, с их помощью можно получать данные по уровню экспрессии большого количества генов; высокопроизводительное параллельное секвенирование РНК (NGS) [1]. Методы гибридизации и высокопроизводительного секвенирования являются «золотыми стандартами» оценки экспрессии генов, однако предусматривают наличие объемного и дорогостоящего оборудования, закупку которых могут позволить далеко не все рядовые лаборатории, а лишь специализированные медико-генетические центры. Проведение анализа экспрессии генов методом гибридизации требует большие количества РНК, чем те, которые зачастую доступны при проведении ряда экспериментов, например, при наличии незначительных количеств клеток или тканей. В этих случаях методы, основанные на ПЦР, становятся незаменимыми, поскольку ПЦР включает этап амплификации, что делает его более чувствительным. Дополнительное преимущество ПЦР в реальном времени — относительная простота и удобство использования по сравнению с вышеперечисленными методами [2].

Основные этапы протокола количественного анализа экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени:

1. Планирование эксперимента.
2. Выделение и оценка нуклеиновых кислот.
3. Проведение обратной транскрипции (ОТ).
4. Оптимизация режимов ПЦР в реальном времени, постановка ПЦР.

5. Анализ данных, полученных при проведении ПЦР в реальном времени. Абсолютная количественная оценка. Относительная количественная оценка.

Этапы выделения и очистки нуклеиновых кислот и реакция обратной транскрипции сопровождаются рядом трудностей в исполнении и получении объективных результатов [3,4,5].

Так, например, эффективность синтеза кДНК напрямую зависит от качества очистки РНК [6]. Сегодня на рынке присутствуют множество наборов реагентов для очистки РНК, но методика классической фенольной экстракции остается одним из наиболее стандартных подходов [7]. Данная методика не исключает содержания примесей ДНК в выделенном образце РНК, и, наоборот, остаточных количеств РНК в выделенном образце ДНК. Это вызывает трудность при оценке низкоэкспрессионных генов. Остаточные количества геномной ДНК маскируют единичные копии гомологичной кДНК, что приводит к ошибочной оценке результатов ПЦР. Кроме этого, скорость репликации ДНК и деления бактериальных клеток в разы больше, чем в образцах тканей эукариотических клеток.

Методология дизайна тест-системы для изучения экспрессии генов в эукариотической клетке заключается в следующем. Праймеры для участков генов эукариот подбирают так, чтобы они отжигались на последовательности экзонов по обеим сторонам длинного интрона что позволяет осуществить дифференциацию по анализу кривой плавления между амплификацией кДНК и потенциально контаминирующей геномной ДНК, или захватывают границы двух последовательных экзонов, разделенных в геномной ДНК интроном, что исключает амплификацию геномной ДНК. Геном прокариот, в отличие, от генома эукариот, не разделен на кодирующие (экзоны) и некодирующие (интроны) части. Матричная РНК в этом случае синтезируется по генам хромосомной/плазмидной ДНК, из-за чего невозможно подобрать праймеры на стыке участков экзон-экзон, чтобы они не отжигались на кодирующем участке ДНК.

В этом случае при постановке ПЦР имеет смысл использовать дополнительный контроль — пробы РНК, не подвергнутый реакции обратной транскрипции. Это позволит при оценке мРНК определить уровень контаминации геномной ДНК.

Обратная транскрипция является, пожалуй, наиболее проблемной и подверженной вариациям реакцией при проведении ПЦР. Эффективность обратной транскрипции напрямую зависит от выбранных праймеров. В реакции синтеза первичной цепи можно использовать ген-специфичные праймеры, случайные (Random) праймеры или oligo (dT) праймеры. Отсутствие на 3' конце мРНК прокариот poly (A) — хвостов, делает неэффективным использование oligo (dT) праймеров. Поли-(А) последовательности бактериальных мРНК значительно короче соответствующих эукарио-

тических. Их длина, в среднем, составляет всего 14–16 нуклеотидов (80–200 — у эукариот), а полиаденилированы лишь от 1% до 40% молекул мРНК каждого определенного вида в клетке (~100% в случае эукариот). Полиаденилирование мРНК катализирует поли (А) — полимеразы, которая осуществляет независимое от матрицы последовательное присоединение остатков аденилата к 3'-ОН-концам молекул РНК.

Некоторые учебные пособия рекомендуют использовать случайные или ген-специфические праймеры для бактериальных РНК [2]. Однако, ген-специфические праймеры, используемые в ПЦР в реальном времени имеют температуру плавления выше 50 °С, что делает невозможным использование их с классической MMLV ревертазой, имеющий температурный максимум в 42 °С.

Существующие методики и протоколы заточены на работу с эукариотическими клетками. Интерес к изучению молекулярных механизмов экспрессии генов и ее оценки в прокариотической клетке обусловлен недостатком исследований по данному вопросу и рядом методологических проблем [8]. В ряде биологических задач исследование транскриптома бактерий может быть крайне информативным. Так, было показано, что бактерии *Helicobacter pylori* из разных участков одного и того же пораженного желудка не отличаются генетически, но сильно отличаются по уровню экспрессии генов (т.е. бактерии находятся в разных функциональных состояниях). При этом профиль экспрессии может значительно отличаться — до сотни генов с существенно разным уровнем экспрессии [9]. Изучая экспрессию генов, связанных с клеточным циклом у дрожжей, ученые обнаружили, что доминирующие режимы экспрессии могут быть связаны с различными биологическими функциями, такими как фазы клеточного цикла [10].

Целью данной работы являлось изучение механизма экспрессии генов у прокариот на примере генов гиразы B и коллагеназы *Aeromonas salmonicida* AS1.

Объекты и методы

Объекты исследования: штамм *Aeromonas salmonicida* AS1 из лабораторной коллекции:

- *Aeromonas salmonicida*, оживленная культура на TSB-бульоне с глюкозой;
- *Aeromonas salmonicida* на агаризованной среде PCA;
- *Aeromonas salmonicida* на TSB-бульоне с глюкозой без индуктора (24 ч культивирования);
- *Aeromonas salmonicida* на TSB-бульоне с глюкозой с индуктором (24 ч культивирования);
- Активированный *Aeromonas salmonicida* на пептонной среде с индуктором (24 ч культивирования);
- Неактивированный *Aeromonas salmonicida* на пептонной среде с индуктором (24 ч культивирования);

РНК и кДНК перечисленных образцов.

Методы исследования:

Культуральный метод

С целью получения биомассы для выделения РНК использовали глубинный метод культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде (TSB-бульон с глюкозой, богатая пептонная среда) и поверхностный метод культивирования на агаризованной питательной среде (PCA). В качестве индуктора использовали растворимую фракцию коллагена.

Выделение РНК

Для выделения РНК отбирали 50 мкл суспензии (1,0 MacFarland). Выделение РНК проводили методом магнитных частиц на роботизированной станции MagNA Pure LC2.0 Instrument (Roche, Швейцария), используя набор для выделения MagNa Pure LC RNA Isolation Kit High Performance.

Полиаденилирование РНК

Удлинение 5' конца м-РНК проводили с помощью набора E. coli Poly (A)- Polymerase (NEB) согласно протоколу (<https://www.neb.com/products/m0276-ecoli-poly-a-polymerase/>).

Получение кДНК (обратная транскрипция)

Получали кДНК с помощью набора реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ) (ООО «Синтол») согласно инструкции с использованием ген-специфических праймеров, случайного (Random) праймера и праймера собственной разработки с поли (Т) адаптером.

ПЦР

Дизайн праймеров и их проверка с помощью программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Форвард праймер к гену *gyrB*: GTGTCTCCATCC-GTCTGCAA

Реверс праймер к гену *gyrB*: CCTTGATACCGCCCT-CATAGC

Форвард праймер к гену *colA*: TCAGATAGTAG-GTGGAGAGGGTCA

Реверс праймер к гену *colA*: ATCTCATCCGTCAT-CACAGCC

Универсальный ревер праймер: GCCTCTGCCCA-CAATGCT

Выбранные праймеры бактерий были использованы для проведения ПЦР в реальном времени. Температуру плавления определяли *in silico* с применением интерактивной программы uMELTSM (<https://dna.utah.edu/umelt/um.php>).

Постановку ПЦР и изучение экспрессии генов проводили на приборе «АНК 32» (ООО «Синтол», Россия).

Результаты и обсуждение

Для получения клеточной культуры *Aeromonas salmonicida* AS1 с низким уровнем экспрессии генов домашнего хозяйства и гена коллагеназы ее выращивали

на обедненной питательной среде с коллагеном в течение 24 ч до достижения стадии роста клеток выхода на плато. После выделения РНК была проведена ОТ со случайным (Random) праймером с последующей ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами к генам гиразы Б и коллагеназы (Рис.1 и Рис. 2). В качестве отрицательного контроля (ОКО) использовалась

реакция без внесения MMLV ревертазы. Данная реакция позволила нам оценить остаточное количество ДНК в пробе, выделенной РНК.

На Рис. 1 и Рис. 2 видно, что кривые ОКО РНК вышли примерно на тех же циклах, что и кривые опытных образцов — гена гиразы и гена коллагеназы (Ct = 33 – 34 цикл).

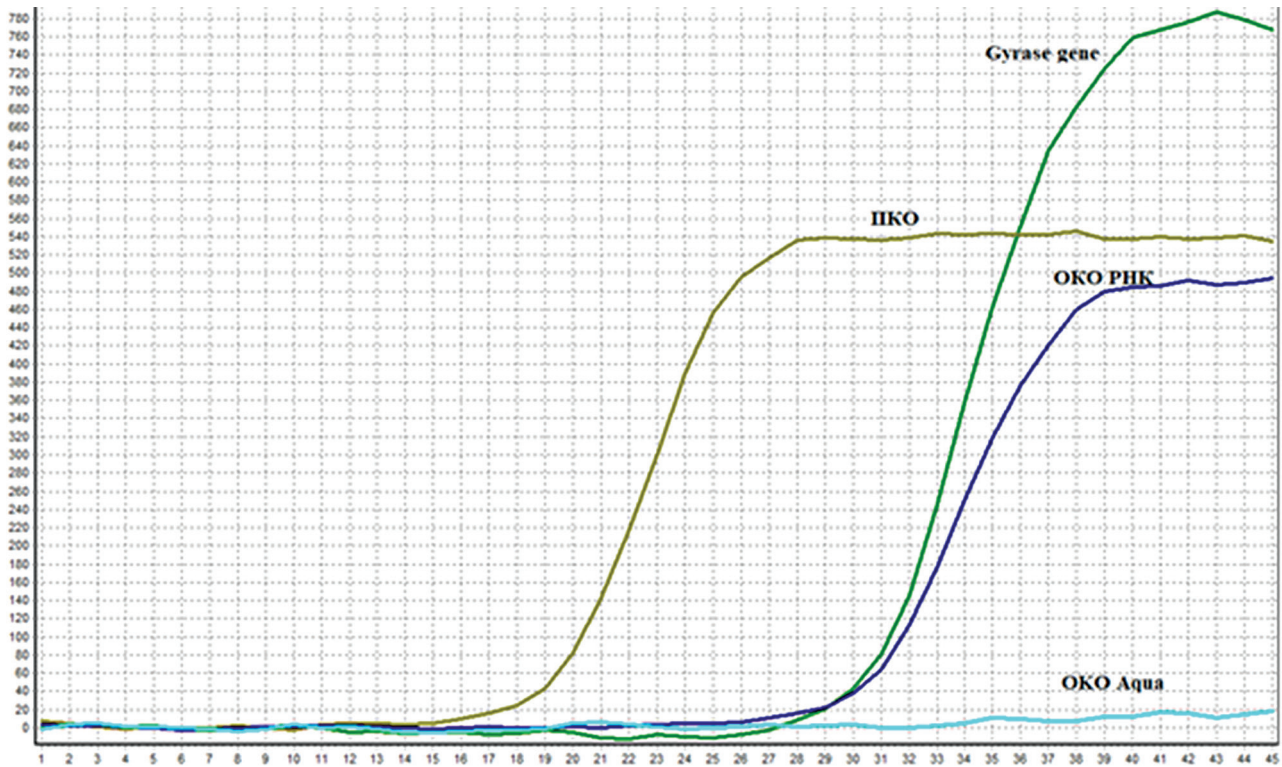


Рис. 1. Кривые амплификации к ДНК, полученной в результате обратной транскрипции со случайным (Random) праймером на ген гиразы Б (Gyrase gene)

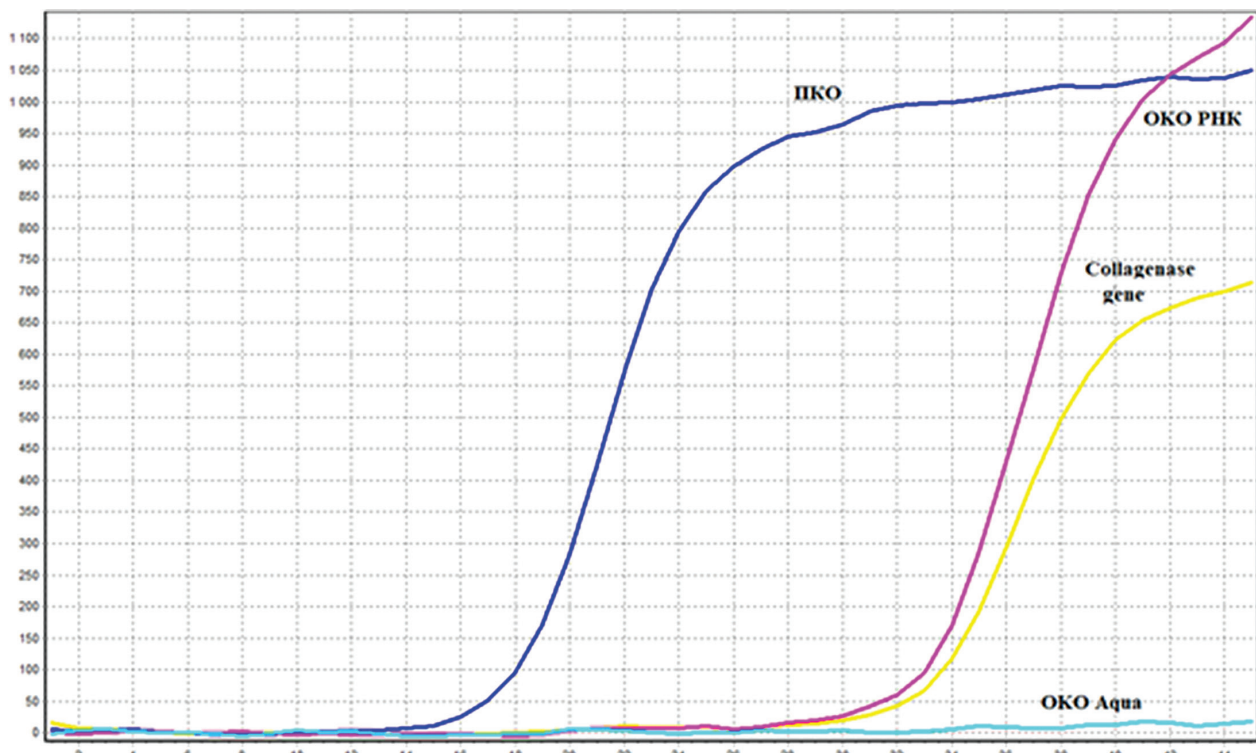


Рис. 2. Кривые амплификации кДНК, полученной в результате обратной транскрипции со случайным (Random) праймером на ген коллагеназы (Collagenase gene)

При этом отрицательные контроли ПЦР реакции (ОКО Aqua) не дали положительной реакции, что говорит о специфичности проведенной реакции и отсутствии праймерных димеров.

Выход кривых амплификации ОКО РНК наряду с кривыми амплификации опытных образцов — генами гиразы и коллагеназы, свидетельствует о содержании примеси остаточной геномной ДНК *A. salmonicida* ASI. Однако, положительная реакция ОКО РНК не означает отсутствие в образце специфической кДНК, фоновая ДНК просто маскирует ее наличие. Содержание примеси остаточной ДНК в образце РНК часто связано с качеством очистки нуклеиновых кислот на этапе выделения и может приводить к ложноположительным результатам ПЦР-ОТ. Высокое содержание фоновой ДНК в пробах выделенной РНК может быть связано с крайне высоким содержанием ДНК в культуральной жидкости отмерших клеток. Соответственно, при использовании Random праймера возникает сложность оценки уровня низкоэкспрессионных генов. К таким генам относится, например, ген коллагеназы *A. salmonicida*, уровень экспрессии которого зависит от питательных свойств среды культивирования и присутствия индукторов синтеза в условиях оптимальной для развития температуры и значения pH. [11].

Для решения проблемы высокого фонового содержания ДНК в пробах РНК нами было принято решение «пришить» к получаемой кДНК праймерный адаптер с негомологичной бактериальной ДНК последовательностью. Праймерный адаптер служил бы местом отжига универсального реверс праймера в ПЦР в реальном времени, что существенно бы повысило специфичность реакции. Однако, «пришить» адаптер к кДНК можно только через oligo (dT) прай-

мер. Но на 3' конце у большинства молекул мРНК прокариот отсутствуют поли-(А) последовательности или они очень короткие, что делает неэффективным использование oligo (dT) праймеров. В подтверждение этого была проведена постановка ОТ с обычным 15T oligo (dT) праймером и образцами выделенной РНК. Полученные результаты подтвердили теоретические данные, oligo (dT) праймер из-за отсутствия поли-(А) последовательности не отжигается на молекуле РНК, и кДНК не синтезируется. В ПЦР в реальном времени кривые амплификации полученных образцов к ДНК вышли на уровне отрицательного контроля, поэтому графические данные мы решили не приводить в этой статье.

Для решения этой проблемы мы использовали протокол полиаденилирования мРНК, который используется для повышения продуктивности синтеза трансгенных белков в клеточных культурах эукариот (NEB).

После выделения РНК было проведено ее полиаденилирование с помощью поли (А) полимеразы *E. coli* (NEB). В обратной транскрипции был использован универсальный якорный праймер 15T oligo (dT) со специальным адаптером. Два крайних нуклеотида праймера по 3' концу комплементарны нуклеотидам стоп-кодона транскрибируемой последовательности ДНК. При постановке ПЦР с кДНК, полученной в результате такой обратной транскрипции, кривая ОКО РНК (проба РНК, не подвергнутая реакции обратной транскрипции) не амплифицировалась. То есть используемый праймер исключает комплементарное соединение с фоновой геномной ДНК и отжигается только на молекуле РНК с поли-(А) последовательностью (Рис. 3).

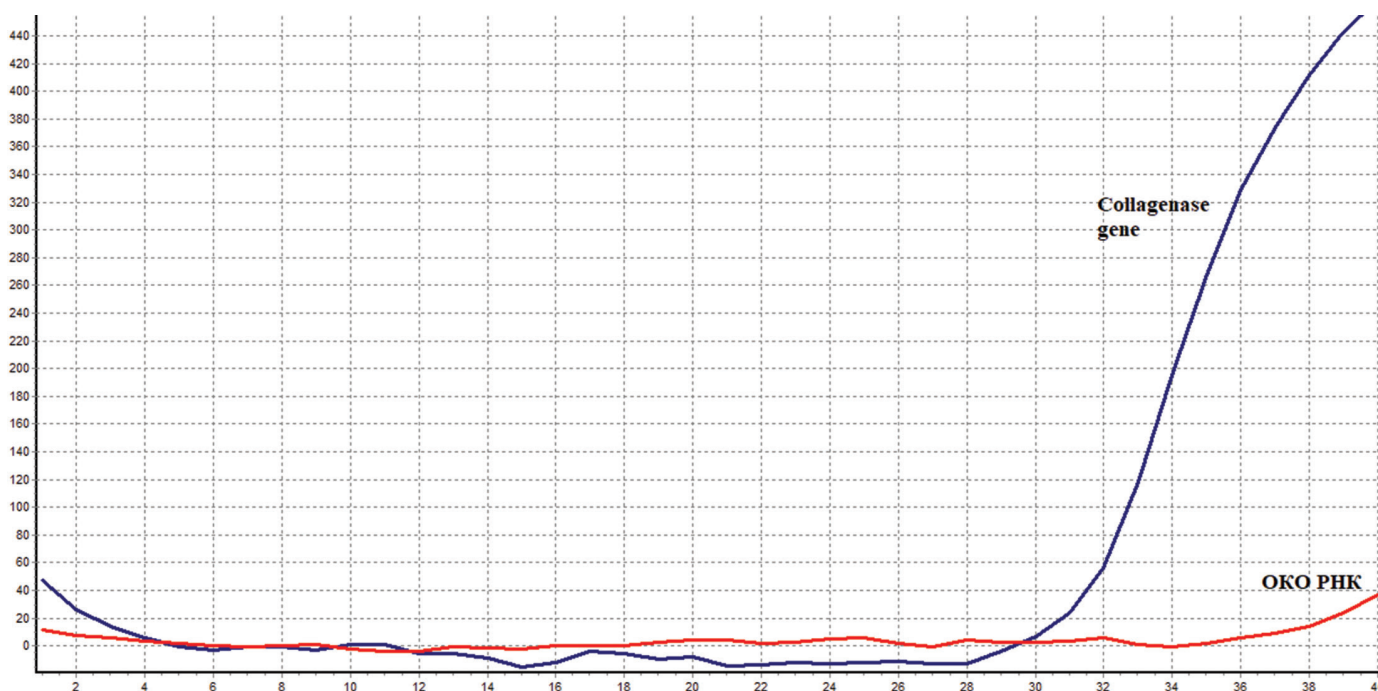


Рис. 3. Кривые амплификации кДНК гена коллагеназы (Collagenase gene), полученной в результате обратной транскрипции с «якорным» 15T oligo (dT) праймером

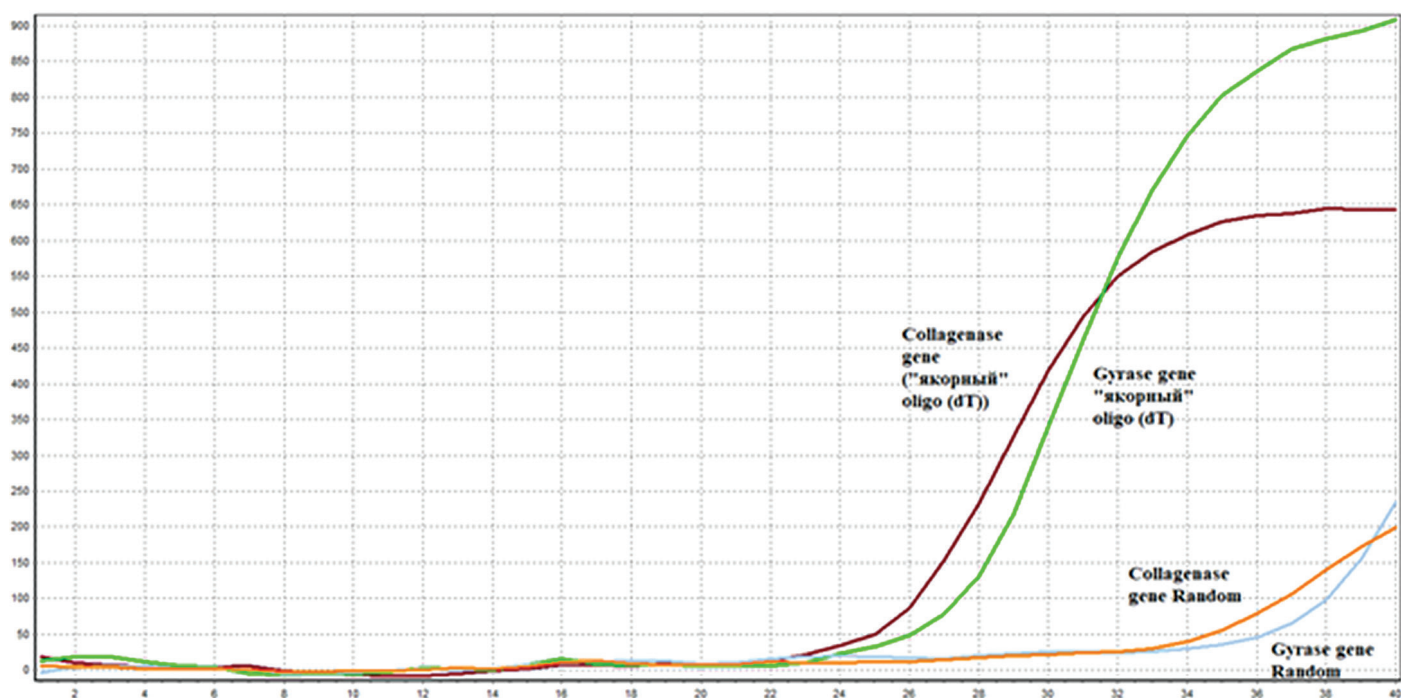


Рис. 4. Кривые амплификации кДНК генов коллагеназы и гиразы *A. salmonicida*. Отбор культуры со среды с глюкозой без индуктора

Наличие в богатой пептонной среде растворимой формы коллагена повышает уровень экспрессии фермента, в то время как среда с глюкозой без индуктора снижает уровень экспрессии гена коллагеназы. Использование разработанного нами протокола ПЦР ОТ, позволяет оценить экспрессию гена коллагеназы на всех этапах культивирования микроорганизма, в том числе и минимальную экспрессию при росте культуры на среде с глюкозой без индуктора. Логарифмический рост кривой амплификации кДНК в этом случае проходит на 26–28 циклах (Рис. 4).

При этом, при использовании Random праймера не удастся оценить низкую экспрессию гена коллагеназы, кривая амплификации кДНК в этом случае либо не выходит на плато, либо выходит на последних циклах ПЦР.

Для заключительного сравнения двух протоколов проведения ОТ были проведены две параллельные постановки с использованием случайного (Random) праймера и смоделированного нами синтетического якорного праймера oligo (dT) с адаптером. С полученными в результате обратной транскрипции кДНК были проведены две параллельные постановки ПЦР. Сравнение результатов ПЦР с использованием кДНК, полученной в результате обратной транскрипции с разными праймерами представлены в Табл. 1.

Как видно в Табл. 1 разница циклов выхода кривых генов гиразы и коллагеназы *Aeromonas salmonicida* (ΔCt) с использованием этих двух протоколов не значительна (примерно 1–2 цикла). Таким образом, использование смоделированного нами синтетического якорного праймера oligo (dT) не повлияло на результаты ПЦР и привело к получению аналогичных с использованием Random праймера данных.

Таблица 1. Сравнительный анализ результатов ПЦР по результатам двух параллельных постановок ОТ

Образец кДНК	Разница циклов выхода кривых генов гиразы и коллагеназы (ΔCt) ОТ со случайным (Random) праймером	Разница циклов выхода кривых генов гиразы и коллагеназы (ΔCt) ОТ с синтетическим roly (T) праймером
<i>Aeromonas salmonicida</i> , оживленная культура на TSB-бульоне с глюкозой	2,03	3,59
<i>Aeromonas salmonicida</i> на агаризованной среде PCA	2,44	3,09
<i>Aeromonas salmonicida</i> на TSB-бульоне с глюкозой без индуктора (24 ч культивирования)	—	0,13
<i>Aeromonas salmonicida</i> на TSB-бульоне с глюкозой с индуктором (24 ч культивирования)	5,51	5,14
Активированный <i>Aeromonas salmonicida</i> на пептонной среде с индуктором (24 ч культивирования)	5,65	7,03
Неактивированный <i>Aeromonas salmonicida</i> на пептонной среде с индуктором (24 ч культивирования)	4,39	3,4

Выводы

В результате проведенных исследований были протестированы применяемые в реакции обратной транскрипции случайный (Random) и праймер oligo (dT) с «якорем» и праймерным адаптером собствен-

ной разработки. Применение oligo (dT) праймера стало возможным только после полиаденирования выделенной РНК с помощью специального набора с поли-А полимеразой.

Установлено, что разработанный нами протокол проведения обратной транскрипции (ОТ) с использованием oligo (dT) праймера и определенной последовательностью адаптера на его 5' конце, предназначенного для дальнейшего отжига реверс-праймера при проведении ПЦР в реальном времени наряду с предварительным полиаденированием РНК исключает специфическую амплификацию остаточной фоновой геномной ДНК.

Данная методика может найти применение в оценке уровня экспрессии низкоэкспрессионных генов при высоком содержании примеси фоновой геномной ДНК в образце РНК, например, на конечной стадии логарифмического роста прокариотической клетки.

Условные обозначения

qПЦР	Количественная полимеразная цепная реакция
Праймер с «якорем» или якорный праймер	Праймер, в котором два крайних нуклеотида по 3' концу комплементарны нуклеотидам стоп-кодона транскрибируемой последовательности ДНК
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
кДНК	Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
3' конец	Конец полинуклеотида, на котором расположен нуклеотид со свободной ОН-группой у третьего углеродного атома рибозы или дезоксирибозы.
5' конец	Конец полинуклеотида, на котором расположен нуклеотид со свободной ОН-группой пятого атома углерода рибозы или дезоксирибозы.
ОТ	Обратная транскрипция
poly (A) — хвосты	Фрагмент молекулы мРНК, азотистые основания которого представлены только аденином
ОКО	Отрицательный контроль

Introduction

Any type of cells in any organism have a complete set of genes special to the organism independent of their function. In any organism, cells of different tissues and organs differ in their functions and expressed proteins. Moreover, at different developmental stages, different proteins are synthesized and function in the same cell. However, any cell contains a certain set of genes that support the vital functions. Such vital genes are expressed in almost all tissues and cells at relatively constant level. They are defined as «housekeeping genes» and function everywhere in the organism at all the stages of life cycle. Methods for gene expression studying use the housekeeping genes as reference genes, versus which the expression of target genes is determined.

While containing full genetic information, each cell, at a certain stage of development, uses only the part that is needed at the moment. Only those genes whose products are needed by the cell immediately to perform its functions are transcribed. The cell must have mechanisms to determine which genes and in what order should be expressed (in other words, give the product, i.e. RNA or protein) and which ones should be suppressed. In this case, mRNA of genes, the expression of which is suppressed rapidly, degrades in the cellular matrix, in contrast to the DNA of dead cells, for example.

The constant change in the expression of certain genes is manifested primarily at the level of transcription. This affects the number of RNA molecules, mainly mRNA.

Therefore, the quantitative analysis of gene expression is the analysis of transcriptome, i.e. transcriptional activity measurement of the gene, by determining the amount of its product, matrix RNA (mRNA), which is universal for most genes. While the final product of gene expression is usually proteins, rather than mRNA.

To measure the amount of mRNA, the following methods have been developed: quantitative real-time PCR (qPCR) used to analyze the expression level of several genes; comparative genomic hybridization on chips (CGH) that allows to register quantitative changes in gene expression directly on chromosomes; microchips that help to obtain data on the expression level of large number of genes; next-generation parallel sequencing of RNA (NGS) [1]. Hybridization and next-generation sequencing methods are the gold standards for gene expression evaluation, but they require the availability of large and expensive equipment. Only specialized medical genetic centers can purchase such equipment, but not all the standard laboratories. Analyzing gene expression by hybridization requires higher level of RNA than usually available in experiments (for example, small amounts of cells or tissues). In these cases, methods based on PCR become irreplaceable, since the PCR includes an amplification step, which makes it more sensitive. An additional advantage of real-time PCR is relative simplicity and ease of use in comparison to the above methods [2].

The main stages of the quantitative analysis protocol of gene expression by the real-time PCR method are:

1. Design of experiment.
2. Isolation and evaluation of nucleic acids.
3. Performing of reverse transcription (RT).
4. Optimization of the real-time PCR modes, PCR run.
5. Analysis of data obtained during real-time PCR. Absolute quantitative evaluation. Relative quantitative evaluation.

The stages of nucleic acid isolation and purification and the reverse transcription are accompanied by a number of difficulties in performing and obtaining objective results [3,4,5].

For example, the efficiency of cDNA synthesis depends directly on the quality of RNA purification [6]. Nowadays,

there are many kits of RNA purification reagents on the market, but the classical phenol extraction technique remains one of the most common approaches [7]. This technique does not exclude the content of DNA impurities in the isolated RNA sample and, conversely, the residual amounts of RNA in the isolated DNA sample. This is a problem for evaluating low-expression genes. Residual amounts of genomic DNA mask single copies of homologous cDNA, which leads to erroneous evaluation of PCR results. In addition, DNA replication rate and bacterial growth rate are several times higher than in eukaryotic tissue samples.

The methodology of test system designing for gene expression evaluation in a eukaryotic cell is as follows. Primers for eukaryotic gene sites are selected so that they are annealed on the exon sequence on both sides of the long intron. This allows differentiation between amplified cDNA and potentially contaminating genomic DNA by the analysis of the melting profile. Furthermore, boundaries of two consecutive exons separated by the intron in the genomic DNA may be included, which prevents genomic DNA amplification. Prokaryotic genome, unlike the eukaryotic one, is not divided into coding (exons) and noncoding (introns) parts. In this case, messenger RNA is synthesized by the genes of chromosomal/plasmid DNA. That is why it is impossible to select the primers at the exon-exon junction, so they are not annealed to the coding region of DNA.

In this case, when running the PCR, it is reasonable to use additional control, RNA samples, not subjected to the reverse transcription. This allows to determine the level of contaminating genomic DNA when evaluating mRNA.

Reverse transcription seems to be the most problematic and varying reaction in PCR. Reverse transcription efficiency directly depends on the selected primers. In the primary chain synthesis reaction, gene-specific primers, i.e. Random primers or oligo (dT) primers may be used. The absence of poly (A)-tails on 3'-terminus of prokaryotic mRNA makes oligo (dT) primers ineffective. The poly (A) sequences of bacterial mRNAs are significantly shorter than the corresponding eukaryotic sequences. Their length is on average only 14 to 16 nucleotides (80 to 200 in eukaryotes), and only 1% to 40% of mRNA molecules of each certain type are polyadenylated (about 100% in the case of eukaryotes). Polyadenylation of mRNA is catalyzed by poly (A)-polymerase, which performs matrix-independent sequential attachment of adenylate residues to 3'-OH-termini of RNA molecules.

Some textbooks recommend using random or gene-specific primers for bacterial RNA [2]. However, gene-specific primers used in real-time PCR have a melting point above 50 °C, which makes it impossible to use them with the classical MMLV revertase acting maximum at 42 °C.

Existing methods and protocols are customized to work with eukaryotic cells. Interest in studying the molecular mechanisms of gene expression and its evaluation in prokaryotes is due to the lack of research and a number of

methodological problems [8]. In a number of biological researches, the study of bacterial transcriptome may be very informative. Thus, it was shown that *Helicobacter pylori* from different parts of the same affected stomach do not differ genetically, but greatly differ in the level of gene expression (i.e. the bacteria are in different functional states). At the same time, the expression profile may significantly differ, so up to hundreds of genes may have significantly different levels of expression [9]. In studies of the expression of genes associated with cell cycle in yeast, scientists have found that dominant expression modes may be associated with various biological functions, such as cell cycle phases [10].

The aim of this work was to study the gene expression mechanism in prokaryotes evidence from *Aeromonas salmonicida* ASI gyrase B and collagenase genes.

Materials and methods

Materials:

Aeromonas salmonicida ASI strain from the laboratory collection:

- *Aeromonas salmonicida*, live culture in TSB broth with glucose;
- *Aeromonas salmonicida* on PCA agar medium;
- *Aeromonas salmonicida* in TSB broth with glucose and no inducer (24-hour incubation);
- *Aeromonas salmonicida* in TSB broth with glucose and inducer (24-hour incubation);
- Activated *Aeromonas salmonicida* on a peptone medium with inducer (24-hour incubation);
- Non-activated *Aeromonas salmonicida* on a peptone medium with inducer (24-hour incubation);
- RNAs and cDNAs from the listed samples.

Methods:

Cultural method

To obtain biomass for RNA extraction, submerged incubation of microorganisms in a liquid medium (TSB broth with glucose, enriched peptone medium) and surface incubation on an agar medium (PCA) were used. A soluble fraction of collagen was used as an inducer.

RNA extraction

For RNA extraction, 50 µl of the suspension was selected (1.0 MacFarland). RNA extraction was carried out by magnetic particles on automated MagNA Pure LC2.0 Instrument (Roche, Switzerland) using High Performance MagNa Pure LC RNA Isolation Kit.

RNA polyadenylation

Elongation of mRNA 5'-terminus was performed using the E. coli Poly (A)-Polymerase (NEB) kit according to the protocol (<https://www.neb.com/products/m0276-ecoli-poly-a-polymerase/>).

Obtaining cDNA (reverse transcription)

The cDNA was obtained by Reverse Transcription (RT) reagent kit (Sintol LLC) according to the instruction using gene specific primers, Random primer and a proprietary primer with a poly (T) adapter.

PCR

Primer design and testing using Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) were carried out.

Forward primer to *gyrB* gene: GTGTCTCCATCCGTCTGCAA

Reverse primer to *gyrB* gene: CCTTGATACCGCCCTCATAGC

Forward primer to *colA* gene: TCAGATAGTAGGTGAGAGGGTCA

Reverse primer to *colA* gene: ATCTCATCCGTCATCACAGCC

Universal reverse primer: GCCTCTGCCACAATGCT

The selected bacterial primers were used to carry out real-time PCR. The melting point was determined *in silico* using uMELT™ interactive software (<https://dna.utah.edu/umelt/um.php>).

PCR running and gene expression studies were performed on ANK 32 instrument (Sintol LLC, Russia).

Results and discussion

To obtain *Aeromonas salmonicida* ASI cell culture with low-level expression of housekeeping genes and collagenase gene, cells were grown on a depleted medium with collagen for 24 hours before reaching the plateau phase. After RNA extraction, RT was performed with Random primer followed by real-time PCR with specific primers to *gyrase B* and collagenase genes (Figure 1 and Figure 2). As a negative control (NC), a reaction without the introduc-

tion of MMLV revertase was used. This reaction allowed to evaluate the residual amount of DNA in the sample of extracted RNA.

Figures 1 and 2 show that NC RNA curves appeared approximately on the same phases as the test sample curves, i.e. *gyrase* gene collagenase genes (Ct = 33 to 34 cycles).

At the same time, negative controls for PCR reaction (NC Aqua) did not show a positive reaction, which indicates reaction specificity and the absence of primer dimers.

The yield of the amplification curves for NC RNA along with the amplification curves for the test samples, *gyrase* and collagenase genes, indicates the presence of *Aeromonas salmonicida* ASI residual genomic DNA. However, the positive reaction of NC RNA does not mean the absence of specific cDNA in the sample, because the background DNA masks its presence. The content of residual DNA contamination in RNA sample is often associated with the purification quality of nucleic acids during the extraction stage and may lead to false positive results of PCR-RT. High content of background DNA in extracted RNA samples can be associated with an extremely high DNA content in the culture fluid from dead cells. Accordingly, when using Random primer, it is difficult to evaluate the level of low-expression genes. Such genes include, for example, *A. salmonicida* collagenase gene, the level of expression of which depends on the nutritional properties of culture medium and the presence of inducers under conditions of temperature and pH optimal for the development [11].

To solve the problem of high background DNA content in RNA samples, we decided to «attach» the primer adapter with non-homologous bacterial DNA sequence to

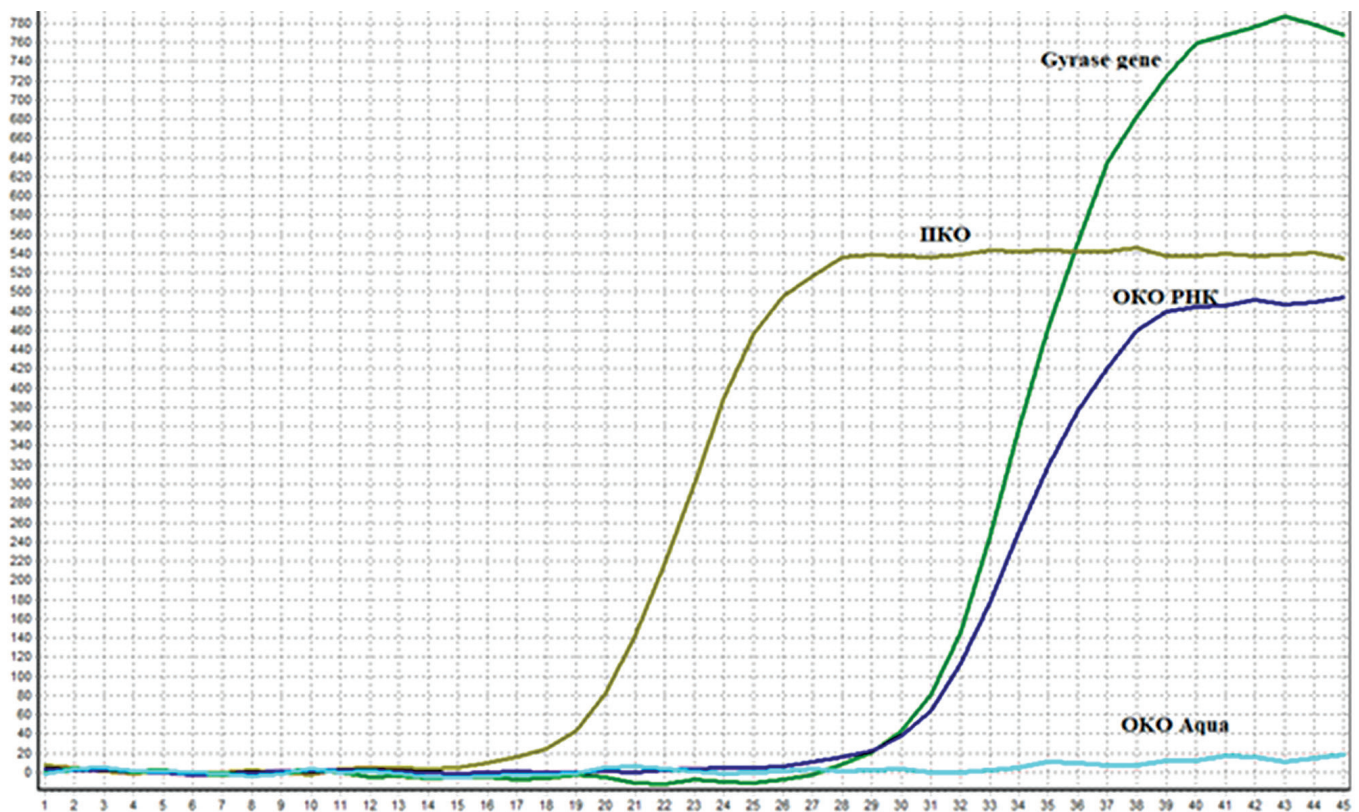


Figure 1. Amplification curves for cDNA obtained as a result of reverse transcription with Random primer to *gyrase B* gene

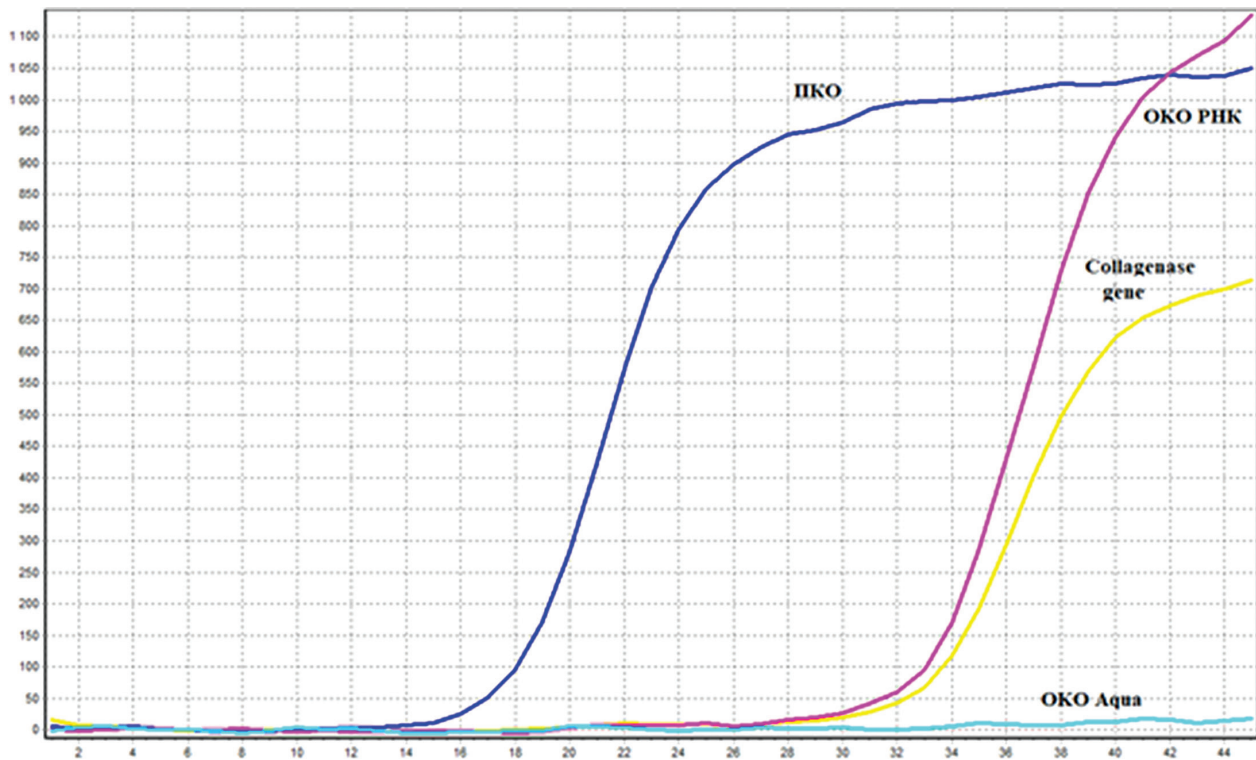


Figure 2. Amplification curves for cDNA obtained as a result of reverse transcription with Random primer to collagenase gene

the cDNA obtained. The primer adapter would serve as the annealing site for the universal reverse primer in real-time PCR, which would significantly increase the specificity of reaction. However, the adapter may be «attached» to the cDNA only via oligo (dT) primer. But most prokaryotic mRNA molecules have very short poly (A) sequences on 3' -terminus or have no such sequences at all, which makes oligo (dT) primers ineffective. To confirm this, RT was performed with conventional 15T oligo (dT) primer and samples of extracted RNA. The obtained results confirmed the theoretical data. Because of the absence of poly (A)

sequence, oligo (dT) primer is not annealed on the RNA molecule, and cDNA is not synthesized. In real-time PCR, the amplification curves of the obtained cDNA samples appeared at the same level as negative control, so we decided not to demonstrate the graphic data in this article.

To solve this problem, we used mRNA polyadenylation protocol, which is applied to increase the synthesis efficiency of transgenic proteins in eukaryotic cell cultures (NEB).

After RNA extraction, its polyadenylation was carried out using poly (A) polymerase of *E. coli* (NEB). Univer-

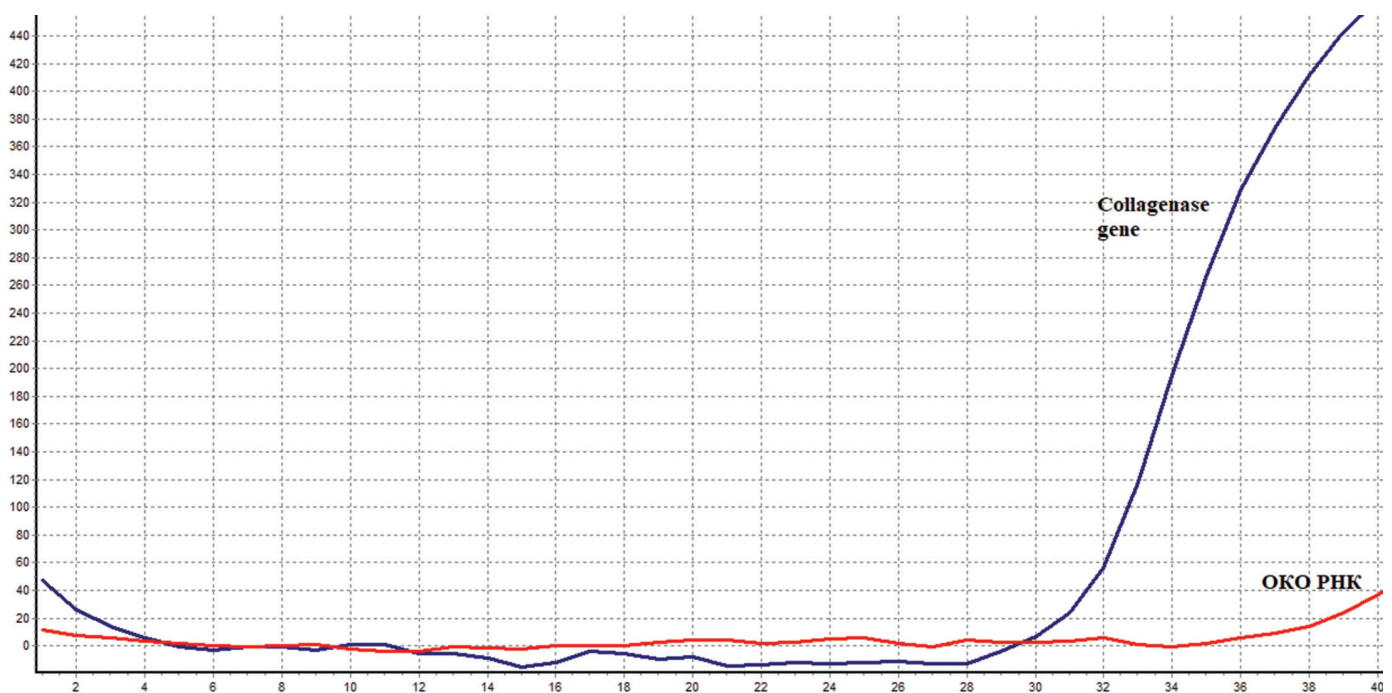


Figure 3. Amplification curves for cDNA of the collagenase gene, obtained as a result of reverse transcription with 15T oligo (dT) anchor primer

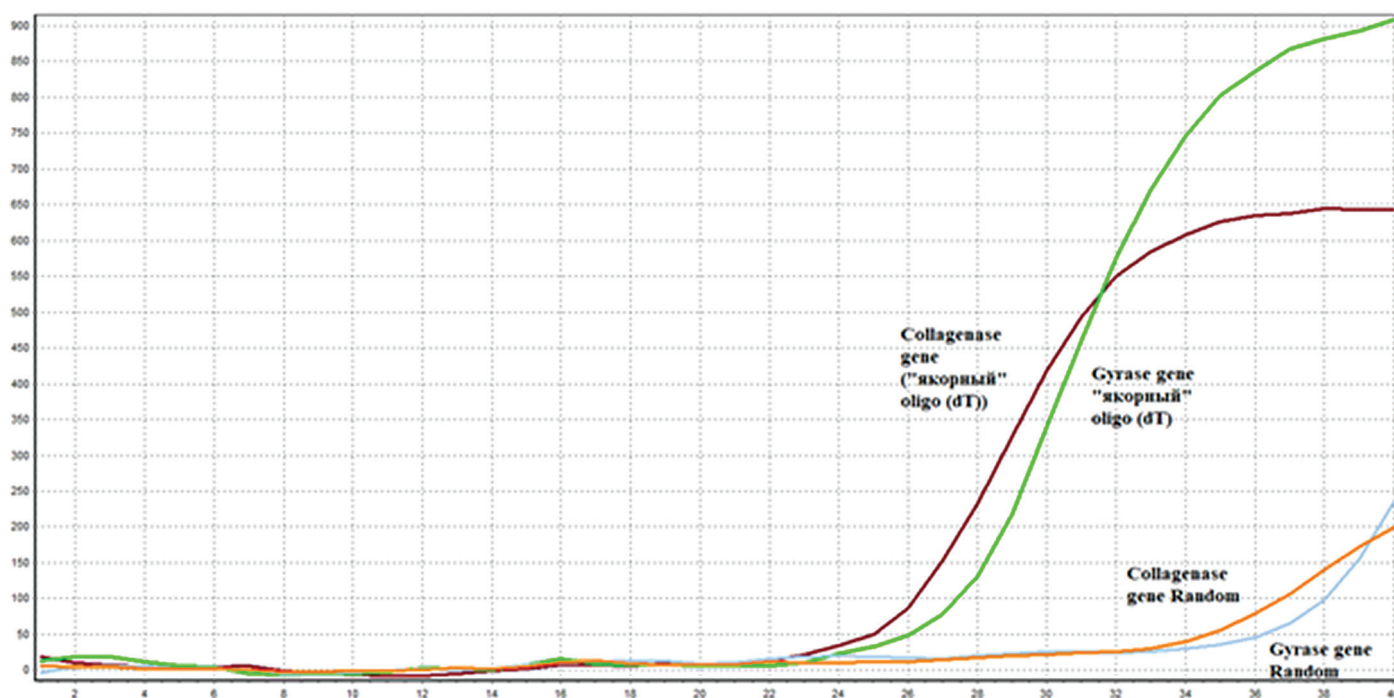


Figure 4. Amplification curves for cDNA of *A. salmonicida* collagenase and gyrase genes. Selection of the culture from the medium with glucose and no inducer

sal 15T oligo (dT) anchor primer with a special adapter was used in the reverse transcription. The two terminal nucleotides of the primer 3'-terminus are complementary to the nucleotides of the transcribed DNA stop codon. When running PCR with the cDNA obtained as a result of such reverse transcription, NC RNA curve (RNA sample not subjected to the reverse transcription) is not amplified. In other words, the primer used prevents complementary bonding to background genomic DNA and is annealed only on RNA molecule with a poly (A) sequence (Figure 3).

The presence of soluble collagen in the enriched peptone medium increases the level of enzyme expression, while the medium with glucose and no inducer reduces the level of collagenase gene expression. Using our PCR RT protocol, we can evaluate the collagenase gene expression at all stages of microorganism incubation, including minimal expression when the culture grows on a medium without glucose and no inducer. In this case, the logarithmic growth of the amplification curve for cDNA occurs after 26 to 28 cycles (Figure 4).

At the same time, when Random primer is used, it is not possible to evaluate the low expression of the collagenase gene, because, in this case, cDNA amplification curve either does not reach the plateau or appears at the last PCR cycles.

For the final comparison of two RT protocols, two parallel runs were performed using Random primer and the developed oligo (dT) anchor primer with adapter. cDNA samples obtained in the reverse transcription were used in two parallel PCR runs. A comparison of PCR results using cDNA obtained in the reverse transcription with different primers is presented in Table 1.

Table 1. Comparative analysis of PCR results from two parallel RT runs

cDNA sample	Difference in the number of cycles for the appearance of the curves for gyrase and collagenase genes (ΔCt) RT with Random primer	Difference in the number of cycles for the appearance of the curves for gyrase and collagenase genes (ΔCt) RT with synthetic poly (T) primer
<i>Aeromonas salmonicida</i> , live culture in TSB broth with glucose	2.03	3.59
<i>Aeromonas salmonicida</i> on PCA agar medium	2.44	3.09
<i>Aeromonas salmonicida</i> in TSB broth with glucose and no inducer (24-hour incubation)	—	0.13
<i>Aeromonas salmonicida</i> in TSB broth with glucose and inducer (24-hour incubation)	5.51	5.14
Activated <i>Aeromonas salmonicida</i> on a peptone medium with inducer (24-hour incubation)	5.65	7.03
Non-activated <i>Aeromonas salmonicida</i> on a peptone medium with inducer (24-hour incubation)	4.39	3.4

As Table 1 shows, the difference in the number of cycles for the appearance of the curves for *Aeromonas salmonicida* gyrase and collagenase genes (ΔCt) using these two protocols is not significant (about 1 to 2 cycles). Thus, the use of the developed oligo (dT) anchor primer did not affect the PCR results and resulted in similar data as for Random primer.

Conclusion

As a result of the research, Random primer and oligo (dT) primer with anchor and adapter of our own design were tested, which are used in the reaction of reverse transcription. The use of oligo (dT) primer became possible only after polyadenylation of extracted RNA using special poly-A polymerase kit.

It is determined that the developed protocol of reverse transcription (RT) using oligo (dT) primer and adapter with certain sequence on its 5'-terminus designed for further annealing of the reverse primer during real-time PCR along with preliminary polyadenylation of RNA excludes specific amplification of the residual background genomic DNA.

This technique may be applied in evaluating the expression level of low-expression genes when high background genomic DNA content is found in the RNA sample, e.g. at the end of logarithmic growth of prokaryotic cells.

Abbreviations and terms

qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
Primer with an «anchor», or anchor primer	Primer with two 3'-terminal nucleotides complementary to stop codon nucleotides of the transcribed DNA sequence
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	Matrix ribonucleic acid
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
3'-terminus	Polynucleotide terminus, on which the nucleotide is located with a free OH-group in the third carbon atom of ribose or deoxyribose.
5'-terminus	Polynucleotide terminus, on which the nucleotide is located with a free OH-group in the fifth carbon atom of ribose or deoxyribose.
RT	Reverse transcription
poly (A)-tails	mRNA molecule fragment, the nitrogen bases of which are represented only by adenine
NC	Negative control

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Sharkey, F.H., Banat, I.M., Marchant, R. (2004). Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3795–3806.
2. Епринцев, А.Е., Попов, В.Н., Федорин, Д.Н. (2008). Идентификация и исследование экспрессии генов Учебно-методическое пособие для вузов. Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 18–29.
3. Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23–39.
4. Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potentials. *BioTechniques*, 26(1), 112–125.
5. Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260.
6. Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., Stolze, Y., Prowe, S., Schwarz, W., Schlüter, A., Liebl, W., Klocke, M. (2016). DNA and RNA Extraction and Quantitative

1. Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Inter-laboratory Comparison. *Bioengineering*, 3(1), 7.
7. Антонова, О.С., Корнева, Н.А., Белов, Ю.В., Курочкин, В.Е. (2010). Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии. *Обзор. Научное приборостроение*, 20(1), 3–9.
8. Bachoon, D.S., Chen, F., Hodson, R.E. (2001). RNA recovery and detection of mRNA by RT-PCR from preserved prokaryotic samples. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 127–132.
9. Ребриков, Д.В., Ильинский, В.В., Коростин, Д.О., Шубина, Е.С. (2014). NGS: высокопроизводительное секвенирование. М, БИНОМ. Лаборатория знаний. — 232 с.
10. Liebermeister, W. (2002). Linear modes of gene expression determined by independent component analysis. *Bioinformatics*, 18(1), 51–60.
11. Конон, А.Д., Петровский, С.В., Шамбурова, М.Ю., Уварова, А.В., Козлова, Ю.О., Григорьева, М.В., Москвичев, Б.В. (2016). Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ — перспективных ферментов медицинского назначения. *Медицина экстремальных ситуаций*, 2(56), 45–57.

REFERENCES

1. Sharkey, F.H., Banat, I.M., Marchant, R. (2004). Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3795–3806.
2. Eprintsev, A.E., Popov, V.N., Fedorin, D.N. (2008). Identification and investigation of gene expression. Educational and methodological manual for universities. Publishing and printing center of Voronezh State University, 18–29. (in Russian)
3. Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23–39.
4. Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potentials. *BioTechniques*, 26(1), 112–125.
5. Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260.
6. Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., Stolze, Y., Prowe, S., Schwarz, W., Schlüter, A., Liebl, W., Klocke, M. (2016). DNA and RNA Extraction and Quantitative

1. Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Inter-laboratory Comparison. *Bioengineering*, 3(1), 7.
7. Antonova, O.S., Korneva, N.A., Belov, Yu. V., Kurochkin, V.E. (2010). Methods of nucleic acids purification and separation in molecular biology. (Review). *Scientific Instrumentation*, 20(1), 3–9. (in Russian)
8. Bachoon, D.S., Chen, F., Hodson, R.E. (2001). RNA recovery and detection of mRNA by RT-PCR from preserved prokaryotic samples. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 127–132.
9. Rebrikov, D. V., Il'inskiy, V.V., Korostin, D.O., Shubina, E.S. (2014). NGS: high-performance sequencing. M: BINOM. Knowledge lab. — 232 p. (in Russian)
10. Liebermeister, W. (2002). Linear modes of gene expression determined by independent component analysis. *Bioinformatics*, 18(1), 51–60.
11. Konon, A.D., Petrovskiy, S.V., Shamburova, M.Yu., Uvarova, A.V., Kozlova, Yu.O., Grigoryeva, M.V., Moskvichev, B.V. (2016). Features of clostridial collagenase' biotechnology — emerging enzymes for medical application. *Medicine of Extreme Situations*, 2(56), 45–57. (in Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Минаев Михаил Юрьевич — кандидат технических наук, руководитель направления молекулярно-биологических исследований, ведущий научный сотрудник в лаборатории «Гигиена производства и микробиология» Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,
Тел.: +7-495-676-60-11
E-mail: m.minaev@fncps.ru
*автор для переписки

Махова Анжелика Александровна — младший научный сотрудник лаборатории «Гигиена производства и микробиология» Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,
Тел.: +7-495-676-60-11
E-mail: a.mahova@fncps.ru

Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.

Минаев М.Ю. разрабатывал научно-методический подход к проведению работ, определял объем исследований, анализировал полученные данные, выполнял описательную часть и корректировала финальную версию статьи.

Махова А.А. отбирала объекты исследования, проводила выделение РНК, обратную транскрипцию, постановки ПЦР, выполняла описательную часть.

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 27.05.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Mikhail Yu. Minaev — candidate of sciences, a head of the Molecular diagnostic division, leading researcher of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-60-11
E-mail: m.minaev@fncps.ru
*corresponding author

Anzhelika A. Makhova — junior researcher of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-60-11
E-mail: a.mahova@fncps.ru

Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

Minaev M. Yu. developed scientific and methodological approaches to work, determined the scope of research, analyzed the data obtained, performed the narrative and corrected it in final.

Makhova A.A. selected research objects, carried out RNA extraction, reverse transcription and PCR analysis, performed the narrative part. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 27.05.2018