

DESIGN OF EXPERIMENTS В РАЗРАБОТКЕ ЭТАПА ПРОБОПОДГОТОВКИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Яровикова М.С. (Университет ИТМО), Бушлаева Е. А. (RnD центр ГЕРОФАРМ)

Научный руководитель – руководитель лаборатории генной инженерии и ферментации Хасаншина З.Р. (RnD центр ГЕРОФАРМ)

Введение. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) используется для измерения количества продукта после каждого раунда амплификации с помощью считывания флуоресценции. ПЦР-РВ позволяет проводить количественную оценку мишени по отношению к образцу с точно известной концентрацией, относительно которого рассчитывается количество ДНК-мишени в опытном образце. Анализ экспрессии рекомбинантного белка на уровне матричной РНК (мРНК) является одним из подходов скрининга штаммов-продуцентов. В настоящее время существует перечень минимальных рекомендаций к проведению и интерпретации результатов ПЦР-РВ, а также к этапу пробоподготовки. В зависимости от цели эксперимента на этапе пробоподготовки необходимо определить количество и оценить степень влияния определённых параметров на исследуемый образец. Влияние параметров на этапе пробоподготовки при выделении мРНК из микробных культур в настоящее время недостаточно изучено. Таким образом, актуальной является стандартизация этапа пробоподготовки микробных культур для последующего анализа уровня экспрессии методов ПЦР-РВ [1].

Основная часть. При анализе экспрессии на уровне мРНК важным этапом является остановка транскрипции, которая осуществляется добавлением определенных веществ (рифампицин и т.п.) и зависит от множества факторов. Использование традиционного подхода при определении значимых факторов приводит к проведению большого количества экспериментов. В данной работе для определения значимых факторов и их оптимального значения использовали Design of Experiments (подход DOE). Данный подход позволяет значительно сократить количество проводимых экспериментов и получить из них максимальное количество данных, поскольку изменяется не один параметр за раз, а сразу несколько.

На основании патентного и литературного анализа выбраны следующие параметры, которые могли повлиять на количество нуклеиновых кислот во время культивирования микроорганизмов. Эти параметры включают в себя время отбора проб после внесения индуктора, концентрация рифампицина и время инкубации с ним. В качестве отклика использовали цикл количественного определения. [2].

С применением программного обеспечения MODDE 12.1 был построен дизайн эксперимента. Количественную оценку осуществляли с помощью метода ПЦР-РВ с обратной транскрипцией. На основании полученных данных была построена математическая модель, показывающая влияние исследуемых параметров.

Выводы. Определены параметры, оказывающие существенное влияние на остановку транскрипции микробных культур для анализа уровня экспрессии рекомбинантного белка. С помощью подхода DOE подобраны оптимальные условия для проведения дальнейших экспериментов.

Список использованных источников:

1. Svec D., How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments // *Biomolecular Detection and Quantification*. 2015. (3). С. 9–16.
2. Bustin S. A., *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative*

Яровикова М.С. (автор)

Подпись

Хасаншина З.Р. (научный руководитель)

Подпись