

*Костюк С.А., Полуян О.С.*

**Методические особенности подбора праймеров  
для молекулярно-генетических исследований на примере гена  
дофамин-бета-гидроксилазы**

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного  
образования», г. Минск, Беларусь

Одним из ключевых белков синтеза дофамина является дофамин-бета-гидроксилаза, кодируемая геном DBH (dopamine beta-hydroxylase), который расположен на 9 хромосоме. В зависимости от наличия/отсутствия полиморфизмов в гене DBH изменяется и активность данного фермента. При этом снижение активности дофамин-бета-гидроксилазы является одним из патогенетических механизмов развития многочисленных заболеваний.

**Цель.** Подобрать специфические пары праймеров для определения структуры гена DBH.

**Материалы и методы.** В качестве биологического материала использовали сыворотку крови 32 добровольцев. В качестве мишени для дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров выбран ген DBH. Дизайн олигонуклеотидов осуществляли последовательно для каждого выбранного гомологичного участка с использованием бесплатного онлайн приложения Primer3 v. 0.4.0

(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>) и бесплатного онлайн алгоритма `mfold/DNAfold` (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form>). Для анализа вероятности образования вторичных шпильчатых структур и димеров олигонуклеотидов использовали бесплатное онлайн обеспечение `OligoAnalyzer 3.1` (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и демонстрационную версию коммерческого программного пакета `Vector NTI Advance 11.0` (<http://www.thermofisher.com/by/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software/vector-nti-advance-software.html>). В качестве внутреннего контроля использовали последовательность ДНК гена `HPRT1` (hypoxanthine phosphoribosyltransferase, human, Gene ID: 3251, NCBI Reference Sequence: NC\_000023.11) генома человека.

**Результаты.** С использованием соответствующего программного обеспечения были выбраны следующие специфические олигонуклеотидные праймеры (Genebank Accession No. X63418): прямой 5'-GCAAAAGTCAGGCACATGCACC-3' и обратный 5'-GTCAGCGAGATGGGGAGGTGGA-3', при этом обратный праймер на 5'-конце метили флуорофором. Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров провели анализ последовательности предполагаемого ампликона для оценки вероятности образования вторичных шпильчатых структур ампликона, а также вероятности стерических препятствий для связывания олигонуклеотидных праймеров. В результате анализа установлено, что во время протекания ПЦР в режиме реального времени на стадии отжига/элонгации при +60°C все вероятные вторичные шпильчатые структуры были нестабильны в силу отсутствия отрицательных значений изменения свободной энергии Гиббса. Энергетика возможных шпильчатых структур ( $\Delta G$ , kcal/mol) составила 0,84; 0,90; 1,55; 1,77. Дальнейший анализ с использованием встроенного алгоритма `Vector NTI – Thermodynamical properties` показал наличие 23 вероятных вторичных шпильчатых структур, однако в модельных условиях все они характеризовались низкой стабильностью и как следствие низкой вероятностью образования. Анализ вероятности образования стабильных гомодимеров ампликона показал наличие 1 стабильной структуры ( $\Delta G = -4,2$  kcal/mol) из 60 возможных. Результат анализа в режиме `Vector NTI – Oligo Duplexes` показал наличие стабильного гетеродимера обратного олигонуклеотидного праймера. Несмотря на слабоотрицательные значения  $\Delta G$  димеров, до 70% всех молекул рассматриваемых олигонуклеотидов с высокой вероятностью будут находиться в димеризованном состоянии и не будут участвовать в реакции. Этап корректировки величины  $\Delta G$  с помощью температурных и буферных условий не позво-

лил сместить равновесие реакции в нужную сторону в полной мере, однако необходимый результат был достигнут за счет коррекции концентраций и соотношения олигонуклеотидных праймеров в реакционной смеси. Установлено, что для повышения эффективности реакции предпочтительно повышать значения  $\Delta G$  за счет модулирования содержания одно и двухвалентных ионов в реакционной смеси.

**Заключение.** Поиск последовательностей генов, к которым необходимо подобрать праймеры, следует проводить с использованием биоинформационной базы данных NCBI. Для подбора праймеров и условий проведения ПЦР рекомендуется использовать программу Vector NTI, для анализа вероятности образования стабильных димеров – компонент программы Vector NTI Oligo Duplexes.