

МОНИТОРИНГ ЧИСТОТЫ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ

Ю.М. Букреев, Е.Н. Кособокова, С.С. Кардашова, М.В. Пинюгина, В.С. Косоруков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Екатерина Николаевна Кособокова ekkos@mail.ru

Введение. При проведении доклинических исследований безопасности и эффективности лекарственных средств требуется использование стандартизированной модели. В ведущих лабораториях мира помимо ветеринарного контроля проводится генетический мониторинг животных.

Цель исследования — разработка метода генетического контроля чистоты линии лабораторных мышей, основанного на использовании микросателлитов в качестве ДНК-маркеров.

Материалы и методы. Работу выполняли на 2 линиях лабораторных мышей: C57BL/6J и BALB/cJLac. При проведении полимеразной цепной реакции использовали 5 праймеров: (GAG)6C, (CTC)6C, (CTC)6A, AG9-1, AG9-2. Результаты анализировали в 1,5 % агарозном геле.

Результаты. Три из изученных праймеров позволяют достоверно различить 2 линии мышей. В целях контроля результатов был получен заведомо ложный вариант посредством скрещивания животных разных линий, который позволил оценить ревалентность каждого из праймеров. Данные свидетельствуют о том, что при перекрестном скрещивании каждая из линий вносит свой вклад в распределение аллелей в локусах. По результатам работы была составлена таблица распределения аллелей в локусах, выявляемых при помощи ДНК-маркирования, для каждой из использованных линий.

Заключение. Наши результаты свидетельствуют о том, что данный метод — быстрый, надежный и дешевый способ генетического мониторинга лабораторных животных.

Ключевые слова: C57BL/6J, BALB/cJLac, ДНК-маркеры

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-86-91

DNA-MARKERS FOR GENETIC MONITORING OF LABORATORY MOUSE

Yu. M. Bukreev, E. N. Kosobokova, S. S. Kardashova, M. V. Pinyugina, V. S. Kosorukov

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. The use of standardized model is required at preclinical researches of drug safety and efficiency. Apart of veterinary control the leading laboratories of the world use genetic monitoring of animals.

Objective: to develop the method for detecting genetic contamination of laboratory mouse based on microsatellite DNA markers analysis.

Materials and methods. We tested two lines of mice C57BL/6J and BALB/cJLac. We used 5 primers: (GAG)6C, (CTC)6C, (CTC)6A, AG9-1, AG9-2. We weighted the results of polymerase chain reaction using 1.5 % agarous gel.

Results. Three of tested primers allowed to distinguish 2 lines of mice statistically reliably. Two mice lines were bred to control the results. Our data shows track of every line gives a boots in assortment of alleles in locuses. We composed a table of alleles assortment in locuses for every line based of results.

Conclusion. Our results prove that this method provides fast, reliable and cost-effective way of genetic monitoring.

Key words: C57BL/6J, BALB/cJLac, DNA-markers

Введение

Лабораторные мыши *Mus musculus* являются одним из наиболее востребованных видов при проведении доклинических исследований безопасности и эффективности лекарственных средств и изучении ряда заболеваний человека. На долю мышей приходится 60 % таких исследований [1]; усилиями лабораторий разных стран выведено более 200 линий мышей методом тесного инбридинга. Наиболее

широко используются линии C57BL/6 [2] и BALB/c [3]. Одни из преимуществ мышей C57BL/6 — стабильность и легкость разведения. Это также первая мышьяная линия, геном которой был полностью секвенирован (в 2005 г. на 2-м месте после генома человека). Мыши BALB/c представляют собой альбиносную, инбредную линию. Они также характеризуются легкостью разведения и минимальными вариациями массы тела между самками и самцами. Обе

линии мышей используются в исследованиях в области терапии рака и иммунологии.

Эксперименты на животных занимают серьезную часть в доклинических испытаниях лекарственных средств [4]. Известно, что тесты *in vitro* не могут заменить процессов, регистрируемых *in vivo*. Реакция живого организма на то или иное вмешательство гораздо более сложная, чем совокупность ответов отдельных типов клеток. Во многих случаях затруднительно, а порой невозможно экстраполировать результаты, полученные на культуре клеток или ткани, на целый организм. Только *in vivo* исследования дают адекватный ответ на вопрос, что происходит в организме при введении того или иного препарата.

Любая живая система является многопараметрической, в природной популяции наблюдаются серьезные различия по показателям между отдельными особями. Сокращение разброса данных стало одной из причин использования линейных животных.

Для получения статистически достоверных и воспроизводимых результатов требуется стандартизованная модель, что обеспечивается использованием инбредных линий животных [5]. Инбредные животные, подобно однойщевым близнецам, гомозиготны. Они ценны тем, что являются генетически однородными и характеризуются схожими реакциями на воздействие физиологических, химических и патогенных факторов.

Нарушение гомозиготности возможно в результате отдельных мутаций, а также случайного участия в процессе разведения производителя из другой линии (особенно при культивировании в одном виварии нескольких линий животных с одинаковой окраской). Так как морфологические признаки не могут служить критерием оценки чистоты линии, единственным надежным способом является генетический контроль, который не только помогает подтвердить однородность животных, выбранных для конкретного эксперимента, но и определить их принадлежность к той или иной линии в случае закупки животных в сторонней организации.

В качестве методов генетического контроля можно использовать разные подходы.

1. Массовый SNV (single nucleotide variant) анализ позволяет дифференцировать особей и линии. Но эти варианты недостаточно хорошо охарактеризованы, и часто возникают сложности разделения SNV и ошибок секвенирования.

2. Полногеномное или полноэкзомное секвенирование позволяет сравнивать геномы отдельных особей. Но в настоящее время данный метод является дорогостоящим, и его использование в рутинном режиме экономически нецелесообразно.

3. Использование микросателлитов в качестве ДНК-маркеров. Самый популярный на сегодняшний день метод генетического мониторинга.

Микросателлиты — это короткие tandemные повторы, состоящие из 2–6 пар нуклеотидов. Для них характерно [6]:

- стабильное наследование, в связи с чем они чрезвычайно консервативны от одной генерации к другой;
- уникальность для индивидуума;
- полная идентичность для всех клеток одного и того же индивидуума;
- высокая степень полиморфности среди разных линий.

Как результат, микросателлитные последовательности широко применяются для персональной идентификации, в популяционной генетике и для построения филогенетических связей в систематике [7, 8].

Существует несколько путей анализа микросателлитов. Все они основаны на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, комплементарными либо непосредственно микросателлитным последовательностям, либо участкам между ними. Помимо этого, становится популярен метод мультиплексной ПЦР. В этом случае используется более 1 пары олигонуклеотидных праймеров. Таким образом, контроль осуществляется сразу по нескольким ДНК-маркерам [8].

Цель нашей работы заключается в разработке метода генетического мониторинга чистоты линии лабораторных мышей при сохранении жизни животных, достаточно быстрого для получения информации о поступивших в виварий животных во время содержания их в период карантина.

Материалы и методы

Линии лабораторных мышей. В рамках работы проанализировали 148 животных разного пола и линий, полученных из разных источников (табл. 1).

Праймеры. Для отработки метода использовали 5 праймеров (табл. 2), подобранных на основании литературных данных [9] и синтезированных для нас компанией «Евроген» (Россия).

Таблица 1. Линии лабораторных мышей, используемые в работе

Название линии	Источник	Пол, количество животных
C57BL/6J	Виварий НМИЦ онкологии	♀25 ♂20
BALB/cJLac	Столбовая Виварий НМИЦ онкологии Пушино	♀5 ♂8 ♀19 ♂21 ♂4
Гибридное поколение от скрещивания ♀ C57BL/6J и ♂ BALB/cJLac	Виварий НМИЦ онкологии	♀12 ♂11
Гибридное поколение от скрещивания ♀ BALB/cJLac и ♂ C57BL/6J	Виварий НМИЦ онкологии	♀10 ♂13

Таблица 2. Праймеры, используемые в работе

№	Наименование	Последовательность	Длина	Температура отжига, °C
1	(GAG)6C	GAGGAGGAGGAGGAGGAGC	19	59
2	(CTC)6C	CTCCTCCTCCTCCTCCTCC	19	59
3	(CTC)6A	CTCCTCCTCCTCCTCCTCA	19	57
4	AG9-1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGC	19	53
5	AG9-2	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	19	53

Выделение ДНК. Геномную ДНК выделяли из ушной раковины животных при помощи наборов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва) согласно рекомендациям производителя.

ПЦР. Для амплификации геномной ДНК использовали систему AccuPrime™ с ДНК-полимеразой Taq (Invitrogen, США). ПЦР проводили в термоциклере Empla 4 (Biokom, Россия). Протокол амплификации представлен в табл. 3.

Таблица 3. Протокол амплификации для разных праймеров

Праймеры	Программа			
(GAG)6C (CTC)6C (CTC)6A	I	94 °C 59 °C 70 °C		60 с 40 с 40 с
	II	94 °C 58 °C 70 °C	35 циклов	40 с 30 с 40 с
	III	70 °C		180 с
AG9-1 AG9-2	I	94 °C 53 °C 70 °C		60 с 40 с 40 с
	II	94 °C 52 °C 70 °C	35 циклов	40 с 30 с 40 с
	III	70 °C		180 с

Электрофорез в агарозном геле. Результаты ПЦР оценивали посредством электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Для визуализации ДНК использовали краситель SYBR (Life Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Гели сканировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 312 нм. Величину фрагментов определяли в сравнении с ДНК-маркером GeneRuler™, 100–10000 пар нуклеотидов (п. н.) (Thermo Scientific, Литва).

Для подтверждения надежности визуального анализа был использован метод «слепой» идентификации отдельных особей. При таком подходе исследователь, оценивающий распределение продуктов амплификации, не знал о принадлежности образца

к той или иной линии, но имел возможность его сравнения с имеющимися контролями.

Результаты и обсуждение

Были проанализированы 148 животных (см. табл. 1): BALB/cJLac (57 особей разного пола и из разных источников), C57BL/6J (45 особей разного пола и из разных источников) и гибридные поколения (46 особей разного пола). В качестве праймеров были выбраны фрагменты микросателлитов, упоминающиеся в литературе [9]. Программу амплификации подбирали для каждого праймера отдельно, с варьированием температуры отжига, длительности циклов и их количества. Результаты ПЦР оценивали посредством электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Каждый фрагмент, полученный в результате амплификации, считали отдельным локусом.

Результаты нашей работы показали, что праймеры 2 и 4 непригодны для мониторинга чистоты выведенных линий мышей. Было сложно визуально оценить результаты ПЦР из-за нечеткости и расплывчатости полос амплификатов и наличия шмера. Оценка полученных данных при помощи программного обеспечения GeneTools также не дала четких и повторяющихся результатов. В данной работе не удалось подобрать условия проведения ПЦР, которые бы устранили эти проблемы.

Суммарное количество локусов при использовании праймеров 1, 3 и 5 составило 73. Полученные спектры ампликонов содержат 50, 7 и 16 локусов соответственно (табл. 4), стабильно воспроизводящихся от эксперимента к эксперименту. Их размеры варьируют от 150 до 6000 п. н. В процессе работы стало понятно, что данные праймеры легко реагируют на изменение условий проведения ПЦР и даже при смене производителя наборов для проведения амплификации или термоциклера необходимо заново подбирать оптимальные температуры отжига и время проведения каждого этапа. В данной работе представлены оптимальные условия при использовании системы AccuPrime™ с ДНК-полимеразой Taq (Invitrogen, США) и термоциклера Empla 4 (Biokom, Россия).

Таблица 4. Распределение аллелей в локусах, выявляемых при помощи ДНК-маркирования, для каждой из использованных линий: от легкого амплификата к тяжелому

Порядковый номер локусов (сквозная нумерация)	C57BL/6J	BALB/cJLac
Праймер 1		
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	—
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23	+	—
24	+	+
25	+	+
26	+	—
27	—	+
28	+	+
29	+	+
30	+	+
31	+	+
32	+	+
33	+	+
34	+	+
35	+	+

36	+	+
37	+	—
38	+	—
39	+	+
40	+	+
41	+	—
42	+	+
43	+	+
44	+	+
45	+	+
46	+	+
47	+	+
48	+	+
49	+	+
50	+	+
Праймер 3		
51	+	+
52	—	+
53	—	+
54	—	+
55	+	+
56	+	+
57	+	+
Праймер 5		
58	+	+
59	+	+
60	+	+
61	+	+
62	+	+
63	+	+
64	+	+
65	+	—
66	+	+
67	+	+
68	+	+
69	+	+
70	+	—
71	+	+
72	—	+
73	+	+

Применение выбранных праймеров позволило получить 3 электрофоретических спектра продуктов амплификации участков геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов. Анализ этих спектров позволил сравнить распределение фрагментов 2 линий лабораторных мышей: BALB/cJLac и C57BL/6J (рис. 1).

В целях контроля результатов в работе были использованы гибриды животных исследуемых линий, что позволило оценить ревалентность каждого из праймеров. Полученные данные (рис. 2, 3) свидетельствуют о том, что при перекрестном скрещивании каждая из линий вносит свой вклад в распре-

деление аллелей в локусах, что позволяет проводить визуальную оценку возможного «загрязнения» линии.

Работа была проведена на 148 животных в нескольких (1–4) повторях, полученные результаты были подтверждены методом «слепой» идентификации, который показал 100 % определение принадлежности особи к той или иной линии при использовании праймеров 1, 3 и 5.

На основании полученных данных была составлена таблица распределения аллелей в локусах, выявляемых при помощи ДНК-маркирования, для каждой из использованных линий (см. табл. 4).

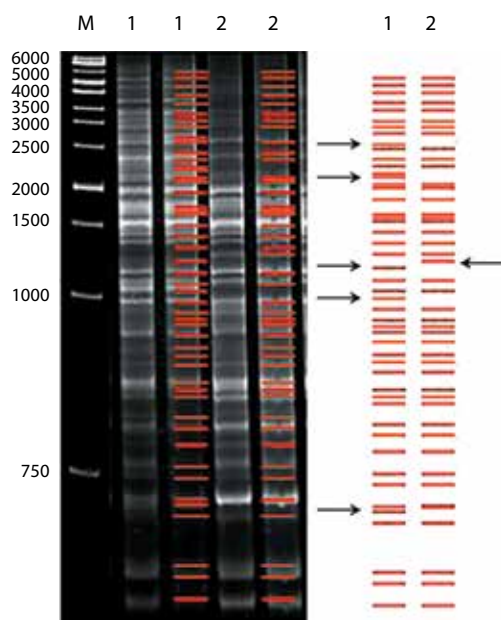


Рис. 1. Электрофоретический спектр амплификатов, полученных при использовании праймера 1: 1 – BALB/cJLac; 2 – C57BL/6J; M – ДНК-маркер. Стрелками указаны амплификаты, специфичные для каждой из линий

Полученные результаты дают нам право утверждать, что анализ чистоты линии лабораторных животных на основе ДНК-маркеров – быстрый, надежный и дешевый способ генетического мониторинга и может быть рекомендован для использования в вивариях.

Заключение

Основная цель многоэтапных доклинических исследований противоопухолевых препаратов заключается в получении максимально точной оценки эффективности и безопасности лекарственного средства. Нередко сложно оценить значимость отклонений у отдельных животных в опытной группе. Большой разброс данных, полученных в доклинических исследованиях, усложняет статистическую обработку материала. Причин возникновения подобной ситуации может быть много. Но перед сотрудниками вивария в первую очередь стоит задача обеспечить исследователей надлежащими животными, чтобы исключить возможность влияния генетической неоднородности группы на результаты эксперимента. Вот почему так важен генетический мониторинг животных, который можно проводить как перед исследованием, так и во время него, если возникла необходимость. Мы ставили перед собой цель разработать простой, быстрый и удобный метод для контроля чистоты линии лабораторных животных.

Применение выбранных праймеров позволило получить 3 электрофоретических спектра продуктов ампликации участков геномной ДНК, фланкиро-

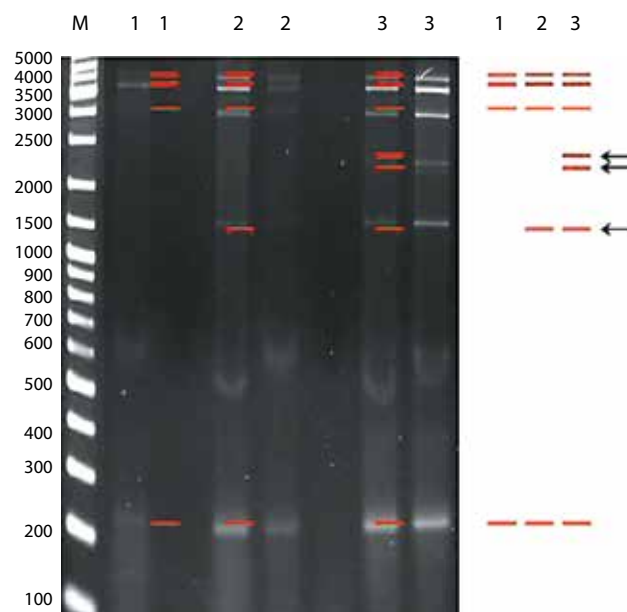


Рис. 2. Электрофоретический спектр амплификатов, полученных при использовании праймера 3: 1 – BALB/cJLac; 2 – перекрестное скрещивание; 3 – C57BL/6J; M – ДНК-маркер. Стрелками указаны амплификаты, специфичные для каждой из линий

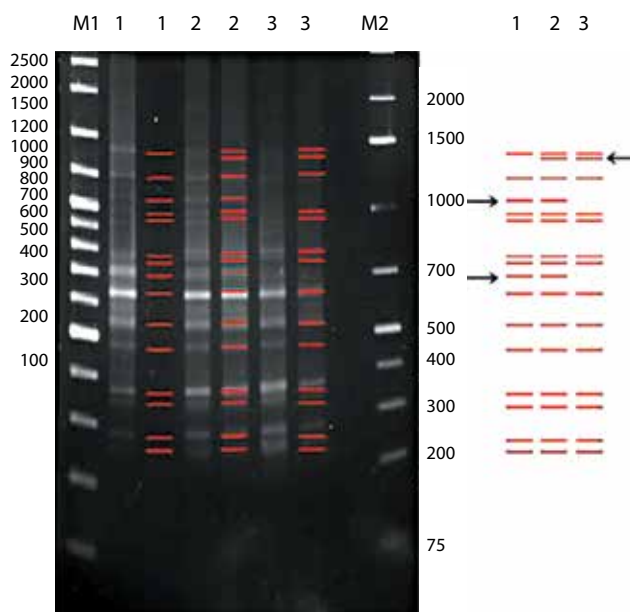


Рис. 3. Электрофоретический спектр амплификатов, полученных при использовании праймера 5: 1 – BALB/cJLac; 2 – перекрестное скрещивание; 3 – C57BL/6J; M1, M2 – ДНК-маркеры. Стрелками указаны амплификаты, специфичные для каждой из линий

ванных инвертированными повторами микросателлитов. Анализ этих спектров позволил сравнить распределение фрагментов 2 линий лабораторных мышей BALB/cJLac, C57BL/6J и поколения мышей, полученных от перекрестного скрещивания этих линий.

На основании полученных данных была составлена таблица распределения аллелей в локусах,

выявляемых при помощи ДНК-маркирования, для каждой из использованных линий. Таблица может служить ориентиром при отработке методики в любой лаборатории.

Несмотря на литературные рекомендации, нами было показано, что праймеры 2 и 4 не могут быть использованы для идентификации линий BALB/cJLac и C57BL/6J ввиду нечетких и не всегда повторяющихся результатов. Однако это не означает, что они будут вести себя аналогичным образом при мониторинге других видов лабораторных животных.

Данный метод, вероятно, может быть применен для контроля длительно перевиваемых клеточных культур. Это отдельное, не менее важное направление в доклинических исследованиях противоопухолевых препаратов. Известно, что опухолевые клетки при длительном культивировании подвержены высокой наследственной изменчивости. Кроме того,

нередко в результате технических ошибок персонала возможно перекрестное заражение клеток разных линий. Морфологически многие клетки трудно различимы, поэтому единственным надежным способом идентификации является генетический контроль.

Вывод

Полученные результаты свидетельствуют о том, что данный метод может быть использован для мониторинга генетической стандартности инбредных линий, а также для подтверждения той или иной линии при получении животных из внешних источников (при наличии референтного образца ДНК). Преимуществом данного метода является то, что мониторинг можно проводить на любом этапе доклинического исследования или до него в кратчайшие сроки.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. EU statistics. Speaking of research. URL: <https://speakingofresearch.com/facts/eu-statistics-animal-research/> (дата обращения: 08.08.2017).
2. C57BL/6J. Overview. The Jackson laboratory. URL: <https://www.jax.org/strain/000664> (дата обращения: 08.08.2017).
3. BALB/cByJ. Overview. The Jackson laboratory. URL: <https://www.jax.org/strain/001026> (дата обращения: 08.08.2017).
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильева и др. М.: Гриф и К., 2012. 944 с.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. М.: Профиль, 2010. 358 с.
6. Jarne P., Lagoda P.J. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol Evol 1996;11(10):424–9. PMID: 21237902.
7. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 1994;20(2):176–83. DOI: 10.1006/geno.1994.1151. PMID: 8020964.
8. Календарь Р. Н., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. Физиология и биохимия культурных растений 2002;34(4):141–56.
9. Глазко В. И. Нано- и микромасштабы в организации генетического материала. Доклады Академии наук 2011;2(436):267–9.