

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-237

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧИСЛА КОПИЙ
ТРАНСГЕННОЙ КАССЕТЫ У МЫШЕЙ ЛИНИИ FUS(1-359) *****COMPARATIVE ANALYSIS OF TRANSGENE COPY NUMBER IN FUS(1-359) MOUSE LINE**

Н. С. Жунусов, А. А. Курбатова, П. Р. Лебедев, С. А. Кушнир, А. А. Авраменко, М. В. Покровский

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

N. S. Zhunusov, A. A. Kurbatova, P. R. Lebedev, S. A. Kushnir, A. A. Avramenko, M. V. Pokrovsky

Belgorod State National Research University

✉ nzhunusov29@gmail.com

Аннотация

Относительный и абсолютный анализ числа копий трансгенной кассеты животных, представляющих собой генетические модели широкого спектра наследственных заболеваний, достиг принципиально нового уровня благодаря переходу от метода саузерн-блот-анализа к (полу-)количественной ПЦР в реальном времени (qPCR) с использованием интеркалирующих красителей или флуоресцентных зондов. Тем не менее качество данного вида анализа может ухудшаться ввиду ненадлежащей статистической обработки данных, а также неверной субъективной интерпретации неоднозначных результатов. Это, в свою очередь, может привести к ошибочной количественной оценке копийности и фенотипизации трансгенных животных моделей. В связи с этим представляется важным выбор правильного подхода к статистической обработке и дизайну проведения высокоточной оценки количества копий анализируемой нуклеотидной последовательности.

Abstract

Relative and absolute copy number analysis of transgenic cassettes in animals serving as genetic models for a wide range of hereditary diseases has reached a new level of precision due to the transition from Southern blot analysis to (semi-)quantitative real-time PCR (qPCR) using intercalating dyes or fluorescent probes. However, the quality of this type of analysis can be compromised by inadequate statistical data processing and subjective misinterpretation of ambiguous results. This, in turn, can lead to erroneous quantification of copy number and phenotypic characterization of transgenic animal models. Therefore, it is crucial to select the appropriate statistical approach and experimental design for highly accurate quantification of the copy number of the analyzed nucleotide sequence.

Трансгенные линии животных широко распространяются в медико-биологической сфере исследований заболеваний человека с целью изучения молекулярно-генетических основ развивающихся наследственных патологий [1]. Результаты этого направления способствуют методическим разработкам эффективной профилактики, персонализированной терапии и высокоточной диагностики множества самых распространенных (нейромышечных, нейродегенеративных, заболеваний крови, новообразований), а также орфанных наследственных заболеваний.

Создание генетических моделей путем редактирования генома животных с использованием методов нецелевого встраивания трансгенной последовательности в виде тандемных повторов представляет собой один из самых первоочередных способов получения организмов — моделей заболеваний человека, гиперэкспрессирующих патологические белки [2, 3].

Для молекулярно-генетического описания получаемых первичных трансгенов и их потомков необходимо проводить точную оценку числа копий встроенного трансгена, позволяющую провести взаимосвязь между эффективностью встраивания чужеродной последовательности в геном животного и проявляемыми фенотипическими признаками, скоррелированными с клиническими проявлениями у человека.

Цель исследования — сравнительный анализ числа копий трансгенной кассеты у мышей линии Fus(1-359).

Материалы и методы. Животные. Fus(1-359) — линия генно-модифицированных мышей на аутбредном бэкграунде CD-1, полученных путем внедрения фрагмента человеческой кДНК FUS 1-359 с помощью плазмидного вектора [4], экспрессирующего патологический вариант белка Fused in sarcoma с высокой предрасположенностью к агрегации в моторных нейронах. Животные были получены из ИФАВ РАН.

В анализ были включены 6 трансгенных гомозиготных самцов, 6 трансгенных гемизиготных самцов (n = 12), а также 3 самца дикого типа (n = 3).

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1346, и гранта ФНТП № 075-15-2021-1346.

© Н. С. Жунусов, А. А. Курбатова, П. Р. Лебедев, С. А. Кушнир, А. А. Авраменко, М. В. Покровский, 2024

ПЦР-анализ в реальном времени проводился с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), включал в себя анализ целевого фрагмента Fus(1-359) в сравнении с 4 генами домашнего хозяйства с известной копийностью в мышинном геноме Gapdh (102 копии), H3c7 (18 копий), Hba1 (4 копии), Hprt1 (самцы — 1 копия, самки — 2 копии). Все образцы были поставлены в 3 повторностях на каждую реакцию с 5 парами праймеров. Содержание очищенной ДНК в реакционной смеси составляло 40 нг.

Дизайн праймеров и параметры амплификации были выполнены с учетом использования единого протокола амплификации на оборудовании CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad lab. Inc., США).

Результаты. Расчет проводился с использованием логарифмической регрессионной модели по формуле:

$$y = b \times \ln(x) + a,$$

где y — переменная ответа (Ct); x — предикторная переменная (количество копий фрагмента); a, b — коэффициенты регрессии.

Результаты расчетов представлены на рис. 1 и 2.

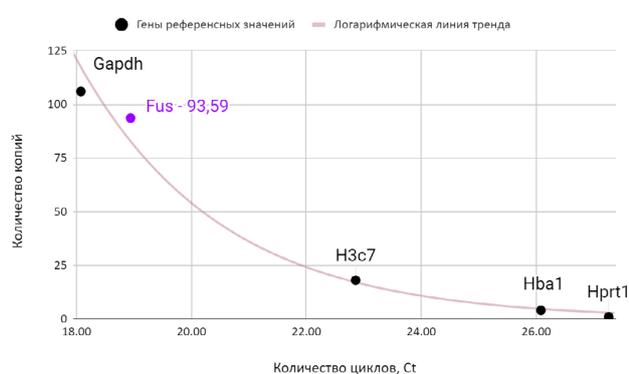


Рис. 1. График логарифмической регрессионной модели для подсчета количества копий трансгена у гомозиготных животных, $y = -2,008 \times \ln(x) + 28,057$

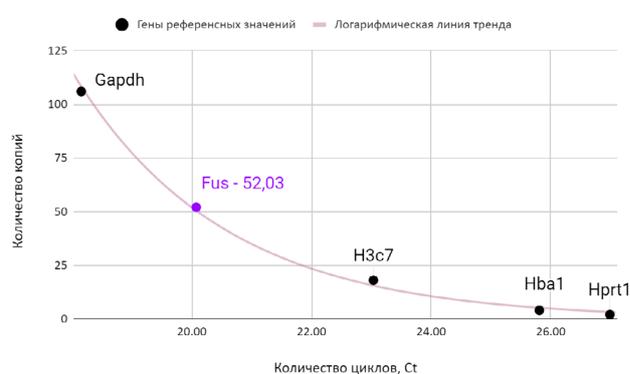


Рис. 2. График логарифмической регрессионной модели для подсчета количества копий трансгена у гемизиготных животных, $y = -2,217 \times \ln(x) + 28,834$

Как видно из полученных данных, сравнение результатов анализа образцов животных самцов представленных генотипов показывает различия в числе копий трансгенной кассеты в 1,799 раза, что соответствует результатам генотипирования животных методом полуколичественной ПЦР в реальном времени, а также фенотипическим проявлением заболевания.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения представленного способа анализа целевого фрагмента относительно референсных значений с целью быстрого определения точного количества числа копий трансгенной кассеты животных моделей, необходимого для правильной оценки корреляции фенотип-генотип.

Литература

1. Shakweer W.M. E., Krivoruchko A. Y., Dessouki S. M., Khattab A.A. A review of transgenic animal techniques and their applications // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2023. Vol. 21 (1). P. 55.
2. Leonova E. I., Reshetnikov V. V., Sopova J. V. CRISPR/Cas-edited pigs for personalized medicine: more than preclinical test-system // Research Results in Pharmacology. 2022. Vol. 8 (3). P. 87–98.
3. Shelkovnikova T.A., Peters O. M., Deykin A. V. et al. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice // The Journal of Biological Chemistry. 2013 Vol. 288 (35). P. 25266–25274.
4. Deikin A. V., Kovrazhkina E. A., Ovchinnikov R. K. et al. A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein // Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova. 2014. Vol. 114 (8). P. 62–69.