

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-277

**ВЫБОР РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОТ-ПЦР НЕЙТРОФИЛОВ СЕЛЕЗЕНКИ  
ЗДОРОВЫХ МЫШЕЙ И МЫШЕЙ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ\*****SELECTION OF REFERENCE GENES FOR QUANTITATIVE RT-PCR OF SPLENIC NEUTROPHILS  
FROM HEALTHY AND TUMOR-BEARING MICE**X. Сунбули<sup>1,2</sup>, Л. А. Алексеева<sup>1</sup>, О. В. Марков<sup>1</sup>, А. В. Сенькова<sup>1</sup>, И. А. Савин<sup>1</sup>, Н. Л. Миронова<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск  
<sup>2</sup>Новосибирский государственный университетKh. Sounbuli<sup>1,2</sup>, L.A. Alekseeva<sup>1</sup>, O.V. Markov<sup>1</sup>, A.V. Sen'kova<sup>1</sup>, I.A. Savin<sup>1</sup>, N.L. Mironova<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk  
<sup>2</sup>Novosibirsk State University

✉ Khetam.sounbuli.edu@gmail.com

**Аннотация**

Экспрессия референсных генов у нейтрофилов может сильно варьироваться при изменении иммунного статуса организма, что может приводить к неправильным выводам при анализе результатов количественной ОТ-ПЦР. В этой работе была изучена стабильность экспрессии 10 потенциальных референсных генов в нейтрофилах селезенки здоровых и мышей-опухоленосителей. После анализа *Hprt1* выдвигается как лучший и стабильно-экспрессируемый референсный ген.

**Abstract**

The expression of reference genes in neutrophils can change dramatically according to the immune status of the organism, which leads to incorrect conclusions when analyzing the results of quantitative RT-PCR. In this study, we investigated gene expression stability of 10 reference genes in the splenic neutrophils of healthy and tumor-bearing mice. *Hprt1* was proposed as the most applicable stable-expressed reference gene.

Количественная ОТ-ПЦР является одним из наиболее популярных методов для изучения экспрессии генов в разных клетках, в том числе в иммунных клетках. Для нормализации результатов ОТ-ПЦР используются референсные гены (или гены домашнего хозяйства), стабильно экспрессирующиеся в изучаемых клетках при разных обстоятельствах. Однако экспрессия потенциальных референсных генов в иммунных клетках, в частности нейтрофилах, может быть нестабильной при изменении иммунного статуса организма, а использование нестабильно экспрессируемого референсного гена приведет к неправильной интерпретации результатов. Таким образом, целью этой работы был выбор референсного гена для исследований экспрессии генов в нейтрофилах в состоянии покоя и при активации. В качестве покоящихся нейтрофилов (без иммунного статуса) были использованы нейтрофилы костного мозга. Нейтрофилы селезенки, в отличие от нейтрофилов костного мозга, могут отражать функциональное состояние нейтрофилов, выполнивших свою роль в организме, например опухоль-ассоциированных нейтрофилов, и поступивших в селезенку для клиренса, что свидетельствует о возможности их использования в качестве активированных нейтрофилов.

Для получения опухоль-ассоциированных нейтрофилов селезенки были использованы модели карциномы легкого Льюис LLC и лимфосаркома RLS<sub>40</sub>. LLC является стабильной моделью, где у всех мышей развивается опухоль, однако RLS<sub>40</sub> — более вариабельная модель, где встречаются мыши со спонтанно редуцируемой опухолью, вероятно, из-за большей активации иммунного ответа. Нейтрофилы были выделены из костного мозга здоровых мышей и из селезенок здоровых мышей или мышей-опухоленосителей. РНК выделяли с помощью реагента Ризол (diaGene), затем готовили кДНК из 2 мкг РНК с помощью обратной транскриптазы MMuLV-RH (Биолабмикс). Экспрессия референсных генов (*Actb*, *Hprt1*, *Gapdh*, *Sdha*, *Ywhaz*, *Tbp*, *B2m*, *Eef2*, *Rpl13a*, *Rack1*) была изучена с помощью ОТ-ПЦР.

Для анализа стабильности экспрессии референсных генов были использованы следующие инструменты: 1) BestKeeper, который предсказывает стабильность гена на основе низких значений стандартного отклонения (SD) и коэффициента вариации (CV) для Ct разных референтных генов [1]; 2) NormFinder, который оценивает

\* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 22-14-00289).

© X. Сунбули, Л. А. Алексеева, О. В. Марков, А. В. Сенькова, И. А. Савин, Н. Л. Миронова, 2024

не только общую вариацию экспрессии, но и анализирует межгрупповую и внутригрупповую вариации экспрессии [2], geNorm, который вычисляет стабильность экспрессии референсного гена как среднее попарное отклонение гена от всех других протестированных референсных генов [3]; Delta Ct ( $\Delta Ct$ ), метод, который предполагает, что если значение  $\Delta Ct$  между двумя референсными генами остается постоянным при анализе в разных образцах, это означает, что оба гена стабильно экспрессируются в этих образцах, а если  $\Delta Ct$  изменяется, то один или оба гена экспрессируются вариабельно [4]; RefFinder, веб-инструмент, который объединяет результаты вышеупомянутых использованных программ и вычисляет значение стабильности для каждого референсного гена для общего итогового рейтинга [5].

Самыми стабильными референсными генами при анализе BestKeeper оказались *Hprt1*, *Tbp*, *Gapdh*. где значения SD для Ct референтных генов были 0,29, 0,49 и 0,5 соответственно. NormFinder предлагал *Hprt1*, *Tbp* и *Ywhaz* как самые стабильные гены, где значение стабильности оказались 0,32, 0,41 и 0,79 соответственно. Алгоритм geNorm показал, что самые стабильные референсные гены — это *Actb*, *Gapdh*, *Ywhaz*, а *Hprt1* оказался на пятом месте после *Tbp*.  $\Delta Ct$  метод предлагал *Hprt1*, *Tbp* и *Ywhaz* как самые стабильные гены. С помощью RefFinder в финальном составном рейтинге гены были расположены в следующем порядке: *Hprt1*, *Tbp*, *Gapdh*, *Actb*, *Ywhaz*, *Eef2*, *Sdha*, *Rack1*, *B2m*, *Rpl13a*, где *Hprt1* был выявлен как самый стабильный референсный ген.

Таким образом, *Hprt1* позиционируется нами как наиболее оптимальный референсный ген для исследований экспрессии генов в нейтрофилах селезенки здоровых мышей и мышей-опухоленосителей.

### Литература

1. Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper — Excel-based tool using pair-wise correlations // *Biotechnology Letters*. 2004. Vol. 26. P. 509–515.
2. Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // *Cancer research*. 2004. Vol. 64. P. 5245–5250.
3. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // *Genome biology*. 2002. Vol. 3.
4. Silver N., Best S., Jiang J., Thein S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR // *BMC molecular biology*. 2006. Vol. 7. P. 33.
5. Xie F., Wang J., Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes // *Functional & Integrative Genomics*. 2023. Vol. 23. P. 125.