

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-48-52>



ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛИНИЙ МЫШЕЙ ПО ГЕНУ *TPH2* В РУТИННОЙ ПРАКТИКЕ: ВЫБОР МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР

К.А. Курбаков, А.А. Кибиткина*, Л.В. Федулова, Е.Р. Василевская, Г.С. Толмачева

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
109316, Российская Федерация, Москва, ул. Талалихина, 26

Для использования биомоделей с нокаутом гена *TPH2* в экспериментах ключевым моментом является разработка быстрого и высокоточного протокола генотипирования. В настоящее время генотипирование мутантных мышей проводится с помощью методов, включающих секвенирование или многоступенчатую ПЦР, являющиеся дорогостоящими и занимающими продолжительное время. В работе приведён сравнительный анализ двух методов: с помощью детекции продуктов амплификации гелем-электрофореграммой и ПЦР в реальном времени. Также рассмотрена процедура выделения ДНК из фрагментов хвостов мышей.

Ключевые слова: ПЦР, выделение ДНК, ген *TPH2*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Курбаков К.А., Кибиткина А.А., Федулова Л.В., Василевская Е.Р., Толмачева Г.С. Генотипирование линий мышей по гену *TPH2* в рутинной практике: выбор методики выделения ДНК для проведения ПЦР. *Биомедицина*. 2021;17(3E):48–52. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-48-52>

Поступила 15.04.2021

Принята после доработки 11.05.2021

Опубликована 20.10.2021

GENOTYPING OF MICE LINES FOR THE *TPH2* GENE IN ROUTINE PRACTICE: SELECTION OF A DNA EXTRACTION TECHNIQUE FOR PCR

Konstantin A. Kurbakov, Anastasiya A. Kibitkina*, Liliya V. Fedilova,
Ekaterina R. Vasilevskaya, Galina S. Tolmacheva

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences
109316, Russian Federation, Moscow, Talalikhina Str., 26

The development of a fast and highly accurate genotyping protocol is crucial for the use of biomodels with *TPH2* gene knockout in experiments. Genotyping of mutant mice is currently carried out using methods that include sequencing or multi-stage PCR. These methods are expensive and time-consuming. This paper presents a comparative analysis of two methods: detection of amplification products by gel electrophoregram and real-time PCR. The procedure for extracting DNA from fragments of mice tails is also considered.

Keywords: PCR, DNA extraction, gene *TPH2*

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Kurbakov K.A., Kibitkina A.A., Fedilova L.V., Vasilevskaya E.R., Tolmacheva G.S. Genotyping of Mice Lines for the *TPH2* Gene in Routine Practice: Selection of a DNA Extraction Technique for PCR. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):48–52. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-48-52>

Submitted 15.04.2021

Revised 11.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

Снижение экспрессии и функции триптофангидроксилазы 2 (*TRH2*), являющейся ферментом, лимитирующим скорость выработки серотонина мозга из триптофана, связаны с тревожностью, депрессией и агрессией у различных видов, включая человека и грызунов [8]. В связи с чем мутантные мыши с нокаутом гена *TRH2* являются высокоточной биомоделью [2, 4]. Отбор тканей производится, как правило, биопсией хвоста. Так как хрящевая, костная ткань и эпителий являются сложными для выделения ДНК объектами [10], предлагаются различные варианты модификаций методик [7, 9]. В качестве альтернативы предложено предварительное замораживание биопсий в жидком азоте [9]. Идентификация, как правило, осуществляется ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза. Gutknecht с соавт. [5] использовали систему трёх праймеров для идентификации «дикого» и мутантного аллелей гена *TRH2*, результатом ПЦР являлись ампликоны длиной 437 и 387 азотистых оснований.

Целью настоящей работы являлось сравнение методов генотипирования и выделения ДНК мутантных мышей по гену *TRH2*.

Материалы и методы

Мутантные мыши с нокаутом *TRH2* получены от поголовья гетерозиготных мышей C57BL/6J *TRH2*hCMVcre SPF-категории племенной колонии Бицентра ZEMM (Вюрцбург, Германия) [4]. Отбор фрагментов хвоста (по два образца 2–3 мм) от особей дикого типа (WT: 1–3), гетерозиготных нокаутных *TRH2* (HET: 4–6), гомозиготных нокаутных *TRH2* (KO: 7–9) производили с использованием Новокаина («Нижфарм», Россия), обработкой раневой поверхности Капрамином («ВладМива», Россия). Один образец подвергали длительному лизису (18 ч); второй — замораживанию в жидком азоте. Выделение ДНК проводили на-

бором Сорб-ГМО-Б согласно инструкции («Синтол», Россия). Для проведения ПЦР использовали праймеры: *TRH2* F KO 5' CACCCACCTTGCAGAAATGTTTA 3', ампликон длиной 387; *TRH2* F WT 5' TGGGGCATCTCAGGACGTAAGT 3', ампликон длиной 437 и *TRH2* R 5' TGGGGCCTGCCGATAGTAACAC 3' [5]. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе АНК-32 («Синтол», Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала праймеры (300 нМ), 2,5× реакционной смеси с красителем EVAgreen («Синтол», Россия) (10 мкл), изолированную ДНК (2 мкл). Режим ПЦР реакции: денатурация (95°C/5 мин); 40 циклов амплификации (95°C/15 сек; 64°C/30 сек и 72°C/10 сек). По полученным циклам отсечения (C_t) в ПЦР с системой трёх праймеров сравнивали выход ДНК, полученный с длительным лизисом ($C_{t_{\text{лиз}}}$) и с замораживанием в жидком азоте ($C_{t_{\text{азот}}}$). Для идентификации проводили отдельные реакции: для обнаружения аллеля «дикого типа» — с парой праймеров *TRH2* F WT и *TRH2* R, для обнаружения мутантного аллеля — с *TRH2* F KO и *TRH2* R. Анализ ПЦР в реальном времени проводили в трёхкратной повторности. В качестве отрицательных контролей использовали реакционные смеси без внесённой ДНК. Среднеарифметический результат трёх повторностей и их стандартного отклонения ($M \pm m$) рассчитывали с использованием Microsoft Excel (2016). Ампликоны, полученные в ПЦР с использованием трёх праймеров, разделяли электрофорезом в TBE буфере в 3% агарозном геле («Thermo Scientific», Испания), окрашивали SIBRgreen I («Силекс», Россия), использовали маркер длин 100–1500 азотистых оснований.

Результаты и их обсуждение

Результаты ПЦР в реальном времени приведены в таблице. В пробирках отрицательных контролей амплификации не наблю-

Таблица. Результаты ПЦР в реальном времени ($M \pm m$)
Table. Results of real-time PCR ($M \pm m$)

№	Продолжительный лизис		Замораживание в жидком азоте				
	Масса навески, мг	$Ct_{\text{лиз}}$	Масса навески, мг	$Ct_{\text{азот}}$	$Ct'(WT)$	$Ct'(KO)$	$\Delta Ct''$
1	5,1	32,67±0,56	4,6	20,40±0,05	19,90±0,10		12,27
2	4,9	29,60±0,04	4,9	20,46±0,03	20,27±0,06		9,14
3	3,6	24,95±0,11	3,6	19,73±0,16	19,67±0,21		5,22
4	2,6	29,98±0,38	2,1	19,62±0,11	20,79±0,17	20,74±0,20	10,36
5	3,7	29,82±0,42	3,5	20,03±0,09	20,66±0,03	20,67±0,08	9,79
6	3,5	31,74±0,39	3,5	20,11±0,12	20,86±0,15	20,71±0,25	11,62
7	5,6	29,53±0,23	5,5	20,17±0,08		19,91±0,07	9,36
8	4,2	29,89±0,4	4,7	20,11±0,19		20,77±0,02	9,78
9	4,8	26,87±0,17	4,6	20,37±0,11		20,56±0,07	6,49

Примечание: * Ct — цикл отсечения; ** — разница значений Ct между образцами, выделенными с длительным лизисом и с замораживанием.

Note: * Ct — cut-off cycle; ** — difference in Ct values between samples isolated during prolonged lysis and freezing.

далось, не было неспецифической реакции образцов 1–3 (WT) с праймерами для обнаружения КО и наоборот.

Установлен лучший выход ДНК для образцов с замораживанием в жидком азоте — цикл отсечения был меньше, чем у образцов, выделенных длительным лизисом (табл.). Наименьшая разница Ct 5,22 соответствовала отношению 0,03 между полученными концентрациями ДНК. При этом наибольшее расхождение массы навески (образец 4) не превышало отношение 0,8, следовательно, масса навесок не вносила значительный вклад в полученные результаты. Ранее были получены близкие значения Ct при выделении ДНК с использованием продолжительного лизиса — Ct образцов, предварительно за-

мороженных в жидком азоте, показывали сходный выход геномной ДНК по сравнению с длительным лизисом [1, 6]. При исследовании гетерозиготных линий мышей нами получены близкие значения Ct , т. к. аллели в образцах соотносятся как 1:1. Идентификация методом ПЦР в реальном времени в двух реакциях позволяла различать между собой WT, КО и HET.

Гель-электрофорез продуктов ПЦР с использованием системы трёх праймеров (рис.) позволил выявить характерные целевые яркие полосы, при этом неспецифических продуктов амплификации не наблюдалось. Для образцов 4–6 (HET) выявлялись две полосы, достаточно близко расположенные друг к другу, свидетельствующие о наличии обеих аллелей. Как видно из ри-

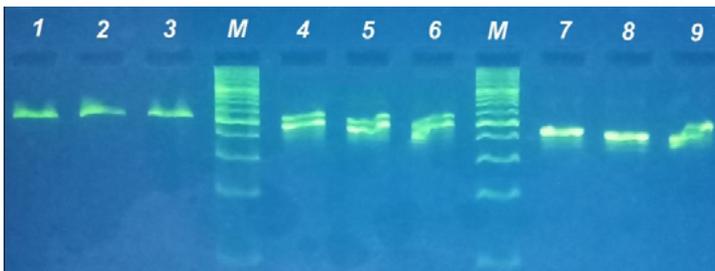


Рис. Разделение продуктов амплификации биопсий мышей гель-электрофорезом. **Условные обозначения:** 1–3 — WT; 2–6 — HET; 7–9 — КО; M — маркер.

Fig. Separation of the products of amplification of mouse biopsies by gel electrophoresis. **Symbols:** 1–3 — WT; 4–6 — HET; 7–9 — KO; M — marker.

сунка, визуальная оценка геле-электрофореграмм в рутинной практике затруднена и не позволяет отличить «дикий тип» (WT) от образца мутантного аллеля (KO).

Заключение

Предварительное замораживание биопсий в жидком азоте даёт больший и более

стабильный выход ДНК, чем длительный лизис. При визуальной оценке геле-электрофореграммы затруднительно отличить «дикий тип» от образца мутантного аллеля. Использование ПЦР в реальном времени в двух реакциях позволяет различить между собой WT, KO и НЕТ гена *TRH2* и занимает меньше времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Петрова Е.С. Поддержание генетически модифицированных линий мышей: вклад в развитие биокolleкций в России. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;2:2–15. [Petrova E.S. Podderzhanie geneticheskii modifitsirovannykh liniy myshey: vklad v razvitie biokollektsiy v Rossii [Maintenance of genetically modified mouse strains: contribution to the development of biocollections in Russia *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy [Laboratory animals for scientific research]*. 2018;2:2–15. (In Russian)]. DOI: 10.29926/2618723X-2018-02-01.
2. Auth C.S., Weidner M.T., Strelakova T. Differential anxiety-related behaviours and brain activation in Tph2-deficient female mice exposed to adverse early environment. *European Neuropsychopharmacology*. 2018;12:19–30. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2018.07.103.
3. *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. QIAGEN, Hilden, Germany. 2006;1–62.
4. Gutknecht L., Araragi N., Merker S., Waider J., Sommerlandt F.M., Mlinar B., Baccini G., Mayer U., Proft F., Hamon M., Schmitt A.G., Corradetti R., Lanfumey L., Lesch K.P. Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification. *PLoS One*. 2012;7(8):e43157. DOI: 10.1371/journal.pone.0043157.
5. Gutknecht L., et al. Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2008;115(8):1127–1132. DOI: 10.1007/s00702-008-0096-6.
6. Minaev M.Y., Solodovnikova G.I., Kurbakov K.A. Selection of DNA matrix for justification of threshold for contamination of proceed meet products with undeclared poultry components. *Theory and practice of meat processing*. 2017;2(1):27–36. DOI: 10.21323/2414-438X-2017-2-1-27-36.
7. Otaño-Rivera V., Boakye A., Grobe N., Almutairi M.M., Kursan S., Mattis L.K., Castrop H., Gurley S.B., Elased K.M., Boivin G.P., Di Fulvio M. A highly efficient strategy to determine genotypes of genetically-engineered mice using genomic DNA purified from hair roots. *Lab. Anim*. 2017;51(2):138–146. DOI: 1177/0023677216646088.
8. Pratelli M., Pasqualetti M. Serotonergic neurotransmission manipulation for the understanding of brain development and function: Learning from Tph2 genetic models. *Biochimie*. 2018;45:234–342. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.11.016.
9. Wang Z., Storm D.R. Extraction of DNA from mouse tails. *Biotechniques*. 2006;41(4):410–412. DOI: 10.2144/000112255.
10. Wheeler A., et al. Comparison of DNA yield and STR success rates from different tissues in embalmed bodies. *Int. J. of Legal Medicine*. 2017;131(1):61–66. DOI: 10.1007/s00414-016-1405-5.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Курбаков Константин Андреевич, ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: homo_ludens@vniimp.ru

Кибиткина Анастасия Анатольевна*, ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: ankib@list.ru

Konstantin A. Kurbakov, V.M. GorbatoV Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: homo_ludens@vniimp.ru

Anastasiya A. Kibitkina*, V.M. GorbatoV Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: ankib@list.ru

Федулова Лилия Вячеславовна, к.т.н., ФГБНУ
«Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: fedulova@vniimp.ru

Василевская Екатерина Романовна, к.т.н.,
ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: e.vasilevskaya@fncps.ru

Толмачева Галина Сергеевна, ФГБНУ
«Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: tgs2991@yandex.ru

Liliya V. Fedilova, Cand. Sci. (Tech.),
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: fedulova@vniimp.ru

Ekaterina R. Vasilevskaya, Cand. Sci. (Tech.),
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: e.vasilevskaya@fncps.ru

Galina S. Tolmacheva, V.M. Gorbatov Federal
Research Center for Food Systems of the Russian
Academy of Sciences;
e-mail: tgs2991@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author