

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации

Инв. №



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН,

*[Signature]* С.О. Бачурин

« 18 » *[Signature]* 2015 г.

**«МЕТОДИКА СОЗДАНИЯ МОДЕЛЬНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ  
ЗАДАННЫЙ НАБОР МОДИФИКАЦИЙ ГЕНОМА, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ  
РЕГУЛИРУЕМОЙ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНОВ;  
ОБЯЗАТЕЛЬНО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КОРОВЫХ ЛИНИЯХ ФЛАКИРУЮЩИХ САЙТОВ  
ДЛЯ CRE ИЛИ FRT РЕКОМБИНАЦИИ; РЕКОМБИНАЗЫ В СОСТАВЕ  
ТРАНСГЕННЫХ КАССЕТ ДОЛЖНЫ БЫТЬ КОНЪЮГИРОВАННЫМИ С  
ЭСТРАГЕНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ И АКТИВИРОВАТЬСЯ ТАМОКСИФЕНОМ»**

СТП-14.621.21.0008.17-2015

Ответственный исполнитель  
Заведующий лабораторией,  
к.б.н.

*[Signature]*

С.Г. Клочков

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

## Оглавление

1. Наименование методики измерений .....	3
2. Назначение методики измерений и область применения .....	3
3. Нормативные ссылки .....	3
4. Погрешность измерений .....	4
5. Требования к показателям точности измерений .....	4
6. Условия измерений .....	4
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики. ....	4
7.1. Реактивы .....	4
7.2. Материалы .....	4
7.3. Оборудование .....	4
8. Операции, связанные с выполнением данной методики .....	5
8.1 Определение гемизиготного и гомозиготного состояния кластера, содержащего FLP кассету. ....	8
8.2 Определение гемизиготного и гомозиготного состояния трансгенного кластера, содержащего NSE/ER-Cre кассету .....	9
8.3 Детекция NSE/ER-Cre-рекомбиназы в геноме мыши .....	9
9. Обработка и оформление результатов измерений .....	10
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды .....	10
11. Требования к квалификации операторов .....	11

## **1. Наименование методики измерений**

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.17-2015 устанавливает методику «Методика создания модельных линий мышей, содержащих заданный набор модификаций генома, необходимых для регулируемой тканеспецифической инактивации генов; обязательно использование в коровых линиях флакирующих сайтов для Cre или FRT рекомбинации; рекомбиназы в составе трансгенных кассет должны быть конъюгированными с эстрагеновым рецептором и активироваться тамоксифеном.»

## **2. Назначение методики измерений и область применения**

Настоящая методика описывает процедуры, выполнение которых необходимо для создания модельных линий мышей, содержащих заданный набор модификаций генома, необходимых для регулируемой тканеспецифической инактивации генов. Основными областями применения данной методики являются биологические и медицинские науки (создание кондиционных нокаутов)

## **3. Нормативные ссылки**

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

#### **4. Погрешность измерений**

Не устанавливаются.

#### **5. Требования к показателям точности измерений**

Не устанавливаются.

#### **6. Условия измерений**

Не устанавливаются.

#### **7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики.**

##### **7.1. Реактивы**

1. Набор DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes, Финляндия)
2. Хлороформ (ACROS Organics, США)
3. 96% этанол
4. TAG pol (Fermentas, США)
5. Фенол (Sigma Aldrich, Германия)

##### **7.2. Материалы**

- 1 Наконечники для микропипеток (Eppendorf AG, Германия)
2. Пробирки тонкостенные 0,2 мл (Eppendorf AG, Германия)
- 3 48-луночные ПЦР-планшеты (Bioplastics, Нидерланды)

##### **7.3. Оборудование**

- 1 Амплификатор Mastercycler nexus (Eppendorf AG, Германия)
2. StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США)
3. Настольная центрифуга (Eppendorf AG, Германия)
4. Микропипетки (Eppendorf AG, Германия)

## 8. Операции, связанные с выполнением данной методики

На сегодняшний день наиболее эффективным методом моделирования патологических последствий нарушения функции ключевого белка в патогенезе заболеваний и рассматриваемого в качестве молекулярной мишени для разработки болезнь-модифицирующих препаратов, является создание линии генетически модифицированных животных с регулируемым нокаутом гена, кодирующего заданный белок. На базе ЦКП ИФАВ РАН проводились работы по получению модельных линий мышей с необходимыми для регулируемого нокаута модификациями генома. В качестве модельной системы для экспериментального востроизводства важного звена патогенеза болезни Паркинсона – функциональной недостаточности альфа-синуклеина в стареющем мозге, была применена технология его регулируемой генетической инактивации, которая включала следующий набор модификаций генома мыши (Рис. 1):

1) Введение двух фланкирующих сайтов для Cre-рекомбинации (LoxP) в геном мыши в первый и второй интроны таким образом, что они окружали второй экзон, кодирующий инициацию трансляции белка гена альфа-синуклеина;

2) Введение двух фланкирующих сайтов для FRT-рекомбинации (FLP) в модифицирующую геном каскету таким образом, чтобы они окружали используемый для селекции ES-клонов ген устойчивости к антибиотику неомицину (neo).

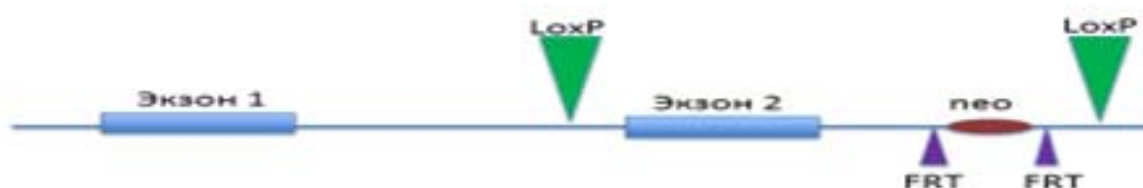


Рисунок 1. Схема генетических модификаций в локусе альфа-синуклеина генома мыши. Первая коровая линия содержит бактериальный ген устойчивости к неомицину (neo), фланкированный сайтами FRT, распознаваемыми FLP-рекомбиназой, и Lox-P сайты, окружающие второй экзон гена альфа-синуклеина.

Методика создания модельных линий на основе регулируемого нокаута включала технологию использования трансгенных FRT- и Cre-рекомбиназ. Были установлены колонии двух вспомогательных линий трансгенных мышей, которые содержали трансгенные кассеты, экспрессирующие FRT- и Cre-рекомбиназы.

В исходной линии (B6.Cg-Tg(ACTFLPe)9205Dym/H на генетическом фоне C57BL/6, полученной из банка генетически модифицированных животных The Jackson Laboratory, трансгенная кассета поддерживалась в гемизиготном состоянии. Для удобства использования трансгенной линии во всех работах, которые могут быть осуществлены в других лабораториях, применяющих технологию регулируемой генетической инактивации других генов, на базе ЦКП ИФАВ РАН трансгенная кассета была переведена в гомозиготное состояние методом перекрестных скрещиваний и анализа генома потомков методом количественного ПЦР в реальном времени.

Вторая вспомогательная линия содержала трансгенную кассету, обеспечивающую экспрессию Cre-рекомбиназы. Экспрессия Cre-рекомбиназы в этой линии осуществляется под контролем регулируемого тканеспецифического промотора нейроспецифической енолазы NSE, что обеспечивает присутствие рекомбиназы только в нейронах. Таким образом, во всех нейронах животного получившего одновременно модификации ДНК фланкированием гена, кодирующего изучаемый белок, и трансгенную кассету с последовательностью Cre-рекомбиназы, будет обеспечена рекомбинация с вырезанием соответствующего гена и его генетическая инактивация. В задании по данному проекту содержалось требование сделать экспрессию Cre-

рекомбиназы регулируемой, а в качестве активатора ее экспрессии использовать томаксифен. Для обеспечения данного требования была выбрана линия, в геноме которой трансгенная кассета содержала N Cre-рекомбиназу, конъюгированную с эстрогеновым рецептором (ER).

Поскольку транскрипция конъюгированной с эстрогеновым рецептором (ER) ER/Cre-рекомбиназы происходит только в присутствии тамоксифена, кодирующая ее последовательность будет «молчащей» в геноме потомков от скрещиваний с данной вспомогательной линией. Инъекции же тамоксифена – препарата, активирующего ядерную транслокацию ER/Cre-рекомбиназы, приведет к специфической и эффективной делеции loxP-фланкированного участка генома мыши, в нашем случае - второго экзона гена  $\alpha$ -синуклеина. Детекция NSE/ER-Cre-рекомбиназы в геноме мыши осуществлялась при помощи конвенционной ПЦР.

Трансгенная кассета NSE/ER-Cre-рекомбиназы поддерживалась в гемизиготном состоянии. Для удобства использования трансгенной линии во всех работах, которые могут быть осуществлены в других лабораториях, применяющих технологию регулируемой генетической инактивации других генов, на базе ЦКП ИФАВ РАН трансгенная кассета была переведена в гомозиготное состояние методом перекрестных скрещиваний и анализа генома потомков методом количественного ПЦР в реальном времени.

Была поставлена методика определения гемизиготного и гомозиготного состояния трансгенного кластера, содержащего NSE/ER-Cre кассету. Таким образом, модификацией генома мыши с помощью модификации фланкирующими сайтами для Cre-рекомбинации и FRT-рекомбинации получена коровая линия (Snca flox(neo)/ flox(neo)) и поставлены методики идентификации данных генетических модификаций.

Одновременно были поставлены методики ведения и генотипирования двух вспомогательных линий, содержащих в геномах трансгенные кассеты, кодирующие Cre-рекомбиназу и FRT-рекомбиназу. Последовательности,

кодирующие рекомбиназы, находятся в составе кассет под тканеспецифичными промоторами и конъюгированы с эстрагеновым рецептором, чувствительным к тамоксифену, что обеспечивает их активацию тамоксифеном.

### **8.1 Определение гемизиготного и гомозиготного состояния кластера, содержащего FLP кассету.**

Выделение ДНК осуществляли при помощи Фенол-хлороформного метода. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на установке StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes, Финляндия) и ROX в качестве референсного красителя. В реакцию брали по 1-5 мкг геномной ДНК на каждый образец. Реакции проводили в тонкостенных 48-луночных ПЦР-планшетах (Bioroplastics, Нидерланды) в трипликах. В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Программа для амплификации включала «горячий старт» (10 мин при 95°C) затем 40 циклов: 15 сек при 95°C и 60 сек при 60°C; определение кривой плавления производилось с шагом 0,3°C. Программное обеспечение StepOne v2.0 (Applied Biosystems, США).

Для анализа соответствующих последовательностей генов использовали праймеры:

qPCR MewFLPeFor: AATGAAGGGCCTAACGGAGTTG  
ActFlpeRev STAGTGCGAAGTAGTGATCAGG

В результате реакции получали фрагмент размером 125 bp.

Праймеры для GAPDH:

GAPDH for CACTGAGCATCTCCCTCACA  
GAPDH rev GTGGGTGCAGCGAACTTTAT



## 8.2 Определение гемизиготного и гомозиготного состояния трансгенного кластера, содержащего NSE/ER-Cre кассету

Количественную ПЦР в реальном времени проводили на установке StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes, Финляндия) и ROX в качестве референсного красителя. В реакцию брали по 1-5 мкг геномной ДНК на каждый образец. Реакции проводили в тонкостенных 48-луночных ПЦР-планшетах (Biorplastics, Нидерланды) в трипликах. В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Программа для амплификации включала «горячий старт» (10 мин при 95°C) затем 40 циклов: 15 сек при 95°C и 60 сек при 60°C; определение кривой плавления производилось с шагом 0,3°C. Программное обеспечение StepOne v2.0 (Applied Biosystems, США).

Для анализа соответствующих последовательностей генов использовали праймеры:

NSE/ER-Cre\_qPCR      CCTGTTTCACTATCCAGGTTACG

NSE1                      ATACCGGAGATCATGCAAGC

В результате реакции получали фрагмент размером 83bp.

## 8.3 Детекция NSE/ER-Cre-рекомбиназы в геноме мыши

Детекцию трансгенной FLP кассеты в геноме мыши осуществляли методом конвенционного ПЦР с использованием следующих праймеров:

Cre/ER1      ATACCGGAGATCATGCAAGC

Cre/ER2      CAAAGCCTGGCACTCTCTTT

ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler nexus (Eppendorf AG, Германия). Реакцию проводили в объеме 25 мкл в буфере, содержащем: 300 mM Трис-НСl pH 8.0, 166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>; дНТФ в концентрации 0,2 mM. Конечная концентрация праймеров составляла 0,5 мкМ каждый. В качестве матрицы использовали 1 мкл ДНК. В реакционную смесь

добавляли 1,25 ед. Taq-полимеразы (NEB, Великобритания). Программа для ПЦР включала первичную денатурацию (2 мин при 94°C), затем 45 циклов: 15 сек при 94°C, 30 сек при 56°C и 45 сек при 72°C. Размер амплифицированного фрагмента составляет 393 bp.

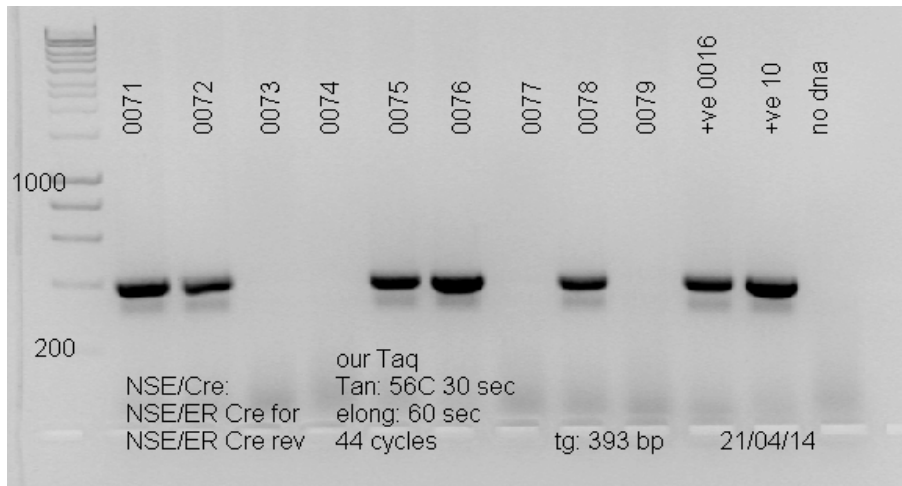


Рисунок 2. Визуализация ПЦР-фрагмента размером 393 пн в 1%-ном агарозном геле.

## 9. Обработка и оформление результатов измерений

Не производится

## 10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

## **11. Требования к квалификации операторов**

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки