

УДК 577.21

**РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСГЕНА НА ОСНОВЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ
РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В МОЛОКЕ рВС1 И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ
НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ ФОНЕ *Mus musculus***

В. А. Калмыков¹, П. А. Кусов^{1,2}, А. В. Дейкин^{1,3,*}

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым 07.12.2018 г.

Поступило 10.12.2018 г.

Разработана мультиплексная ПЦР-тест-система для идентификации в геноме *Mus musculus* регуляторных последовательностей генетических конструкций для трансформации (промотор, инсулятор, терминатор) и для отбора трансгенных животных генотипированием с детекцией методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Предложенная тест-система валидирована при генотипировании мышей-продуцентов лактоферрина человека, белка теплового шока Hsp 70, люциферазы светлячка, лизоцима, полученных методом микроинъекции линейаризованной ДНК в пронуклеус зигот при случайной интеграции трансгена в геном с использованием плазмиды рВС1 для экспрессии интересующего гена в молоке трансформированного животного (Milk Expression Vector Kit).

Ключевые слова: цис-регуляторные последовательности для трансгенеза, мультиплекс ПЦР, тест-система для генотипирования, экспрессия в молоке, экспрессия в молочной железе.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524856750-753>

Технология создания генетически модифицированных животных-продуцентов с молоком рекомбинантных белков выходит на уровень промышленного применения, созданы первые фармацевтические продукты на основе молока таких животных. При экспрессии в молоке белок может быть посттрансляционно модифицирован в клетках животного, его экономически выгодно выделять из молока в препаративных количествах [1]. Конструирование вектора для трансформации предполагает использование функциональных последовательностей для эффективной работы вектора, в том числе цис-регуляторных элементов животного происхождения (промотор *Capra hircus*, инсулятор *Gallus gallus*).

Общепринятым вектором для создания животных-продуцентов в молоке рекомбинантного белка является рВС1 Milk Expression Vector Kit (“Invitrogen”, США) на основе криптической плазмиды *Bacillus subtilis* [2]. С его помощью созданы конструкции для экспрессии рекомбинантных белков в молоке разных видов животных, как крупных

сельскохозяйственных (козы [3, 4], коровы [5] и свиньи [6]), так и лабораторных (мыши [7–10]).

Основным методом определения наличия вставки трансгена в геноме животного-продуцента является ПЦР. И хотя технология ПЦР разработана достаточно хорошо, ключевым этапом применения метода является создание и валидация тест-системы для получения репрезентативных результатов [11]. К сожалению, производитель не предложил универсальную тест-систему для определения генетически модифицированных животных, полученных на основе вектора рВС1, и каждый раз при создании конструкции требуется подбор праймеров, условий ПЦР и её валидация. Сложность разработки стабильной тест-системы связана с высокой вероятностью случайного многокопийного встраивания конструкции при данном методе трансгенеза, с риском фрагментации конструкции при микроинъекции, а также тандемным многокопийным встраиванием в прямой или обратной координации в геном животных. Все эти варианты трансформационных событий могут происходить к тому же на поздних стадиях развития эмбриона, и поэтому трансген будет содержаться только в небольшом числе клеток первичной трансгенной мыши. Всё это повышает вероятность ложноотрицательных результатов, особенно в отношении первичных трансгенных животных. Кроме того, необходимо обеспечить высокую специфичность

¹ Институт биологии гена

Российской Академии наук, Москва

² Сколковский институт науки и технологий,

Сколково Московской обл.

³ Научно-исследовательский институт

общей патологии и патофизиологии, Москва

*E-mail: deikin@igb.ac.ru

праймеров из-за повышенной гомологии между регуляторными элементами генома разных видов для того, чтобы итоговая тест-система эффективно отсекала ложноположительные результаты.

Для тестирования большого числа линий мышей-продуцентов различных белков человека, находящихся в коллекции ЦКП ИБГ РАН, мы разработали универсальную мультиплексную тест-систему для определения трансгена на основе вектора рBC1 и его производных, позволяющую выявлять β -казеиновый промотор *Capra hircus* и β -глобиновый инсулятор *Gallus gallus* из состава конструкций для трансформации, остающихся без изменений при правильной встраивании в геном мыши. Указанные элементы являются критическими для обеспечения эффективной экспрессии трансгена при случайном встраивании в геном, и их наличие не менее важно, чем наличие кодирующей последовательности, для которой по-прежнему необходимо разрабатывать тест-систему de novo. Поэтапному описанию этой разработки посвящено настоящее сообщение.

Подбор последовательностей праймеров. Праймеры подбирали с учётом конечной картины электрофоретического распределения продуктов ПЦР в геле для получения ампликонов длиной 426 п.н. для β -казеинового промотора и 443 п.н. для β -глобинового инсулятора.

В целях отсекажения ложноположительных результатов теста мы подобрали праймеры для амплификации участка гена, кодирующего константную γ -цепь иммуноглобулина А мыши длиной 1174 п.н. (Gene ID: 380793) [12].

Для моделирования электрофореграммы использовали инструмент программы Geneious 11 — «постановка интеллектуального электрофореза» [13]. Для подбора праймеров с заданными параметрами использовали алгоритм средства поиска основного локального выравнивания «NCBI primer BLAST» (basic local alignment search tool) [14].

Оптимизация условий реакции. Для стандартных условий реакции используется 1 мкМ раствор прай-

меров для стандартного объёма реакции 20 мкл. Для мультиплексной ПЦР рекомендуется использовать праймеры для мультиплексной системы в диапазоне концентраций 2–10 мкМ [15]. Отправной точкой для подбора концентрации праймеров в системе было решено принять концентрацию олигонуклеотидов 5 мкМ в общем объёме реакции 20 мкл.

Полимераза, добавленная производителем в используемом нами наборе лиофилизированного премикса для ПЦР Isogene, в процессе реализации каталитической активности сильно снижает температуру раствора, в диапазоне 2–2,5 °С. Термоциклер определяет температуру в месте контакта со стенкой микропробирки, а не в растворе. Таким образом, реальная температура реакции должна быть указана в программаторе термоциклера выше расчётной (56 °С) с учётом этого явления.

Ход реакции. Первичная денатурация при 96 °С, 5 мин, 40 циклов. Вторичная — при 95 °С, 40 с. Отжиг — при 60 °С, 40 с; при 72 °С, 40 с; при 72 °С, 10 мин.

Структура разработанных нами праймеров представлена в табл. 1. Синтез праймеров был осуществлён компанией «Евроген» (Россия). Исходные условия реакции мы сочли неудовлетворительными, так как продукты реакции (ампликоны) в геле показали слишком высокий выход и, как следствие, низкое разрешение сигналов β -cas и β -glob. Для увеличения эффективности работы полимеразы мы провели эксперимент с последовательным увеличением концентрации хлорида магния для определения оптимальной концентрации Mg^{2+} (рис. 1). Для достижения оптимума разрешения сигналов в агарозном геле провели реакции с концентрациями $MgCl_2$, равными 1,6; 2; 2,5 и 3,5 мкМ. Согласно результатам электрофореграммы, наиболее эффективной оказалась концентрация 3,5 мкМ.

После отработки условий реакции с использованием пар праймеров В-cas и В-glob в систему добавили олигонуклеотиды, кодирующие Ig G γ . В итоге мы получили положительные результаты генотипи-

Таблица 1. Структура разработанных праймеров

К β -казеиновому промотору <i>Capra hircus</i> — “b-cas”	
Прямой праймер	AACAAATCCCCACTATCTAGAGAATAAGAT
Обратный праймер	CTTAAGCTATAATGGAGAAAGTAACAAGCT
К β -глобулиновому инсулятору <i>Gallus gallus</i> — “b-glob”	
Прямой праймер	TTTAGGCTGAAAGAGAGATTAGAAATGACA
Обратный праймер	TCTTTGTCCTTCTATCCTATCTTCTATCC
<i>Mus musculus</i> IGHC-2A- γ “IGG”	
Прямой праймер	GATTCCTCTTGAAACTTCTAACTATGAC
Обратный праймер	CTTTATTTATACAAGGGAAGCATGGAGATG

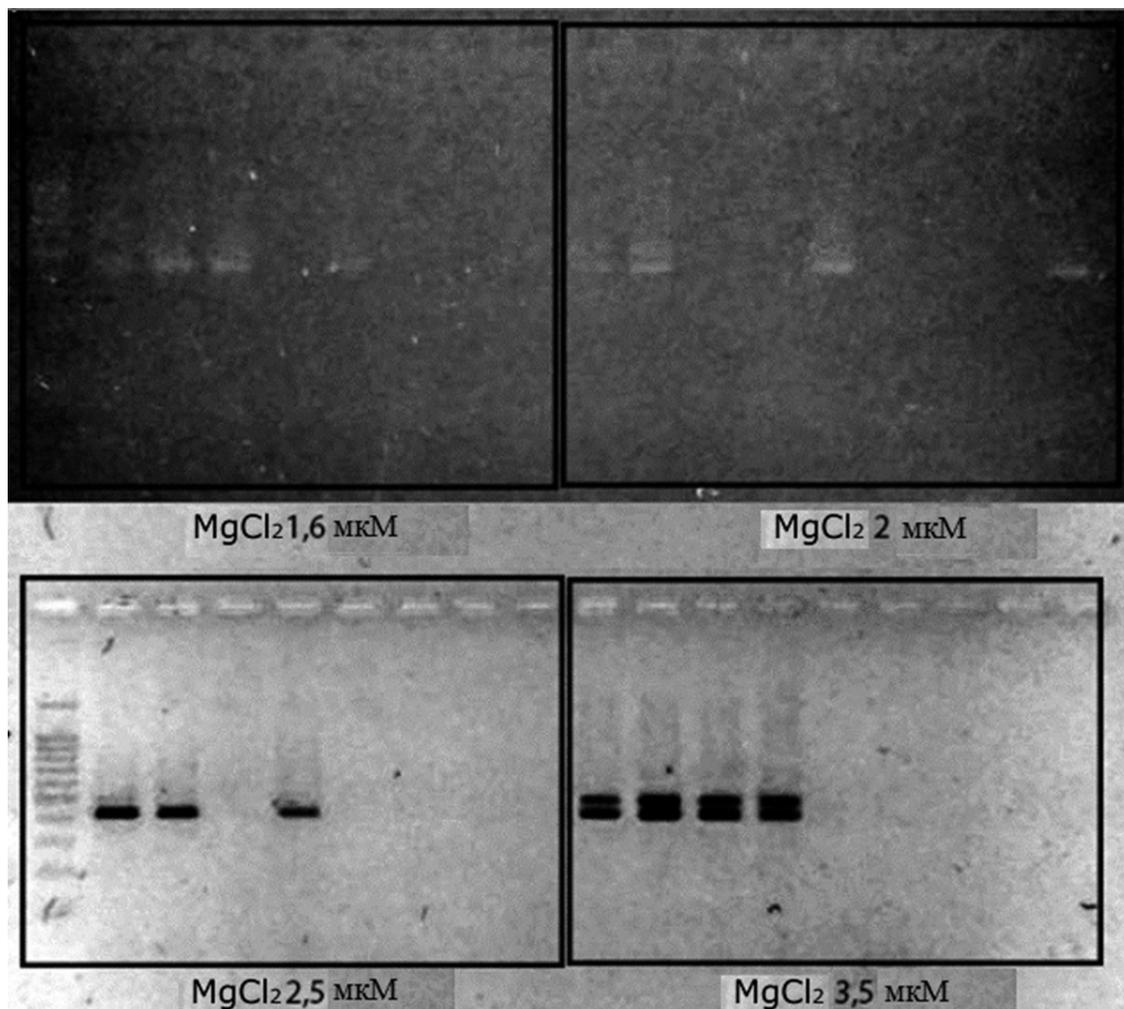


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР (Hsp 70 с праймерами “b-cas” и “b-glob” в 2%-м агарозном геле (буфер ТАЕ) при разной концентрации хлорида магния.

рования с образованием всех трёх ампликонов (рис. 2).

Представленная система мультиплексного анализа ПЦР для детекции регуляторных элементов из геномов *Capra hircus* и *Gallus gallus*, экзогенных по отношению к *Mus musculus*, позволила с уверенностью детектировать трансген.

Разработанная нами система может быть оптимизирована по длине ампликона для генома животного-продуцента подбором к другой консервативной последовательности или при снижении длины ампликона до 800 п.н.

Также система может быть адаптирована для работы с модельными животными разных видов: мыши, козы, кролики и др., для которых необходимо использовать последовательности пар праймеров, высокоаффинных геному животного, для положительного контроля реакции и отказаться от детекции промоторной части при анализе трансгенных коз.

При генотипировании первичных трансгенных мышей мы обнаружили высокую чувствительность данной системы и воспроизводимость результатов. При исследовании выборки более чем в 2000 мышей разных линий повторяемость результатов составила более 98,5%. При анализе генома первичных трансгенных мышей (200 потомков F1) мы выявили вставку конструкции с высокой мозаичностью. У исследуемых животных только 7% несли в геноме рекомбинантную кассету.

Представленная в настоящей работе система может обеспечить паспортизацию животных, используемых в доклинических исследованиях, для повышения качества проводимых исследований и большего соответствия результатов таких экспериментов высоким стандартам медико-фармацевтической отрасли.

В работе использовали приборную базу ЦКП ИБГ РАН.

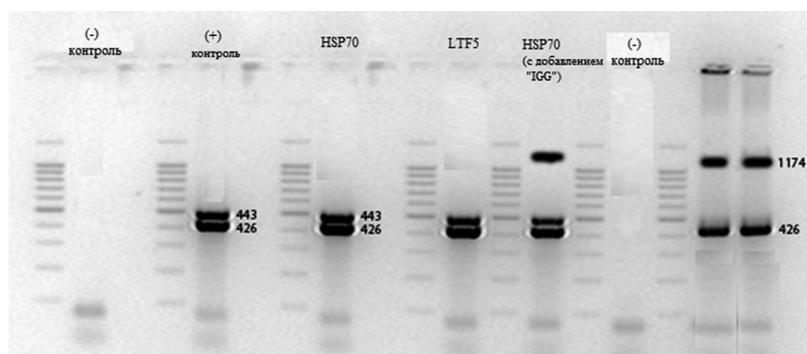


Рис. 2. Электрофореграмма распределения продуктов мультиплексной ПЦР в 2%-м агарозном геле (буфер ТАЕ). Праймеры “b-cas”, “b-glob” и “IGG”. LTF5 — лактоферрин, Hsp 70 — белок теплового шока 70.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 16–14–00150.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. // *Acta Naturae*. 2013. Т. 5. № 1. С. 33–47.
2. De Rossi E., Milano A., Brigidi P., et al. // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. № 2. P. 638–642.
3. Amiri Yekta A., Dalman A., Eftekhari-Yazdi P., et al. // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. № 1. P. 131–142.
4. Zhang J., Li L., Cai Y., et al. // *Protein Expr. Purif.* 2008. V. 57. № 2. P. 127–135.
5. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Y.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., Ermolkevich T.G., Budzevich A.I., Chernousov A.D., Sadchikova E.R. // *Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 90. № 3. P. 513–519.
6. Kaiser G.G., Mucci N.C., González V., et al. // *J. Dairy Sci.* 2017. V. 100 № 3. P. 1605–1617.
7. Tong J., Wei H., Liu X., et al. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. № 2. P. 417–419.
8. Lisauskas S.F.C., Cunha N.B., Vianna G.R., et al. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 12. P. 2063–2069.
9. Zhang R., Rao M., Li C., et al. Functional Recombinant Human Anti-HAV Antibody Expressed in Milk of Transgenic Mice // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. № 3. P. 445–53.
10. dos Santos Ade O., Souza L.F., Borzacov L.M., Villalobos-Salcedo J.M., et al. // *Virolog. J.* 2014. V. 11. P. 16.
11. Qian X., Kraft J., Ni Y., Zhao F.-Q. // *Sci. Rept.* 2014. V. 4. 6465.
12. Arduin E.I., Arora S.I., Bamert P.R., et al. // *Mol. Immunol.* 2015. V. 63. № 2. P. 456–463.
13. Kears M., Moir R., Wilson A., et al. // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 12. P. 1647–1649.
14. Alanio A., Bretagne S. // *Med. Mycol.* 2017. V. 55. № 1. P. 56–62.

MULTIPLEX PCR TEST-SYSTEM DEVELOPMENT FOR THE GENOTYPING OF TRANSGENIC MICE WITH PBC1 MILK EXPRESSION VECTOR-BASED TRANSGENE

V. A. Kalmykov¹, P. A. Kusov^{1,2}, A. V. Deykin^{1,3}

¹*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

²*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow Region, Russian Federation*

³*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS G.P. Georgiev December 7, 2018

Received December 10, 2018

Developed multiplex PCR test-system for identification of transgenic cis-regulatory elements (promoter, insulator) from genetic constructions based on pBC1 Milk expression vector incorporated into the *Mus musculus* genome. Test-system was validated by genotyping producent strains generated by linearized vector DNA microinjection into fertilized zygote with occasional transgene genome integration, expressing the following transgenes in mammary gland, in milk: Human lactoferrin protein in different length, heat-shock protein HSP-70, Firefly luciferase protein, lysozyme protein. Reaction conditions selection described in details for better reproducibility.

Keywords: cis-regulatory sequences in transgenesis, pBC1, milk expression vector, multiplex PCR, mammary gland expression.