
МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ
ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БИОСЕНСОРЫ
ХЛОРА И ВОДОРОДА

© 2022 г. Ю. Н. Давидюк^{1, *}, А. Х. Юсупова²,
Е. О. Петухова^{1, 2}, П. Д. Брежестовский^{2, 3, **}

¹*Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

²*Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия*

³*Institut de Neurosciences des Systemes, Aix-Marseille University, INSERM, INS, Marseille, France*

*E-mail: davi.djuk@mail.ru

**E-mail: pbreges@gmail.com

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 12.09.2022 г.

Принята к публикации 13.09.2022 г.

Модели с генетическими манипуляциями животных получили широкое применение в разных областях медицины и биологических исследованиях. В последние десятилетия были созданы тысячи генетически модифицированных трансгенных моделей мышей, и их производство ускоряется. Поэтому важной проблемой является поддержание и контроль генетической чистоты линий. В наших исследованиях используются линии трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах генетически кодируемые зонды для неинвазивной регистрации ионов хлора (“Cl-Sensor”) и одновременной регистрации хлора и водорода (“ClorHen-sor”). Для поддержания чистоты этих линий нами разработана тест-система для генотипирования трансгенных мышей. Подход характеризуется высокой достоверностью результатов и может быть использован для проведения дальнейшего контроля за генетической чистотой этих линий, а также контроля линий животных с незначительно различающимися участками аминокислотных последовательностей.

Ключевые слова: трансгенные линии, сенсоры хлора и водорода, генетический контроль, ПЦР

DOI: 10.31857/S086981392210003X

В последние десятилетия в рамках исследований в области фотофармакологии и оптосенсорики все шире применяются модели на основе генетически модифицированных линий млекопитающих, в частности лабораторных мышей [1–3]. При этом важной проблемой является поддержание и контроль генетической чистоты линий, так как на нее могут влиять ряд факторов [4]. Генетически модифицированные мыши могут изменять функцию гена путем сверхэкспрессии, элиминации или модификации генного продукта [5, 6]. В частности, было показано, что мутационный процесс в отдельных линиях мышей может приводить к делециям, инсерциям или локальным мутациям, вследствие чего аллели могут не только утратить свои функции, но и приобрести гипоморфный или гиперморфный характер [7]. Также нельзя исключать вероятность случайного скрещивания особей, содержа-

щих различные гены, вследствие чего перед проведением исследований необходимо убедиться в чистоте популяции [4, 8, 9]. Кроме того, необходимо учитывать человеческий фактор при поддержании линий лабораторных животных, который может приводить к смешению линий и появлению гибридного потомства [10]. Поэтому в лабораторной практике применяется ряд методов генотипирования особей поддерживаемых линий [11, 12]. Так, для идентификации и контроля генетической чистоты линий мышей предложены методы ПЦР-анализа и секвенирования коротких tandemных повторяющихся последовательностей [4, 9], ПЦР-анализа и Саузерн-блоттинга геномной ДНК [6, 13], флуоресцентной микроскопии [14].

Таким образом, постоянный контроль генетической чистоты является необходимой процедурой при проведении исследований с использованием трансгенных линий мышей [4, 6]. В наших исследованиях используются созданные ранее линии трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах генетически кодируемые зонды для неинвазивной регистрации ионов хлора (“Cl-Sensor”) [15, 20, 22, 23] и одно-временной регистрации хлора и водорода (“ClopHensor”) [15, 16]. Эти зонды созданы на базе производных зеленого флуоресцентного белка и имеют пересекающиеся спектральные характеристики, а также незначительно различающиеся участки аминокислотных последовательностей [17]. В процессе работы произошло смешивание этих линий и возникла задача их надежного разделения. Поэтому целью исследования была разработка тест-системы для генотипирования используемых линий, обеспечивающей высокую достоверность результатов. Поскольку до настоящего времени тест-системы для генотипирования данных линий разработаны не были, наша тест-система является первой, предназначенной для решения поставленной задачи, что придает исследованию особую ценность.

Современные технологии геномной инженерии позволяют манипулировать геномами животных, обеспечивая платформу для создания все более сложных способов моделирования болезней, а также биосенсорных систем для контроля многих биологических компонент. За последние десятилетия были созданы тысячи генетически модифицированных трансгенных линий мышей [8]. Этот процесс требует все более тщательного контроля поддержания чистоты создаваемых линий животных. Предлагаемая нами тест-система является одним из простых и эффективных подходов которые могут быть использованы для поддержания линий трансгенных животных экспрессирующих генетически кодируемые биосенсоры.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансгенные линии мышей, экспрессирующих “Cl-Sensor” и “ClopHensor”

Биологическим материалом для ПЦР-исследования служили трансгенные мыши в возрасте от 2 мес. до 1 года линий “Cl-Sensor” и “ClopHensor”, различающиеся последовательностью конструкта, встроенного в локус *ROSA26* 6-й хромосомы мышинного генома [42] и экспрессирующегося в нейронах (рис. 1).

Cl-Sensor — это генетически сконструированный белок, состоящий из цианового флуоресцентного белка (CFP) и желтого флуоресцентного белка (YFP), соединенных гибким линкером из 20 аминокислот (рис. 1a). CFP является референтным белком, а YFP — сенсором хлора, флуоресценция которого уменьшается при повышении концентрации этого аниона. Три мутации в последовательности YFP придают ему высокую чувствительность к хлору ($IC_{50} \approx 30$ мМ), что позволяет проводить измерения в физиологическом диапазоне внутриклеточных концентраций аниона [20].

ClopHensor состоит из модифицированного зеленого флуоресцентного белка E²GFP и красного флуоресцентного белка DsRed-m, соединенных гибким линкером, отличающимся по аминокислотному составу от используемого в Cl-Sensor

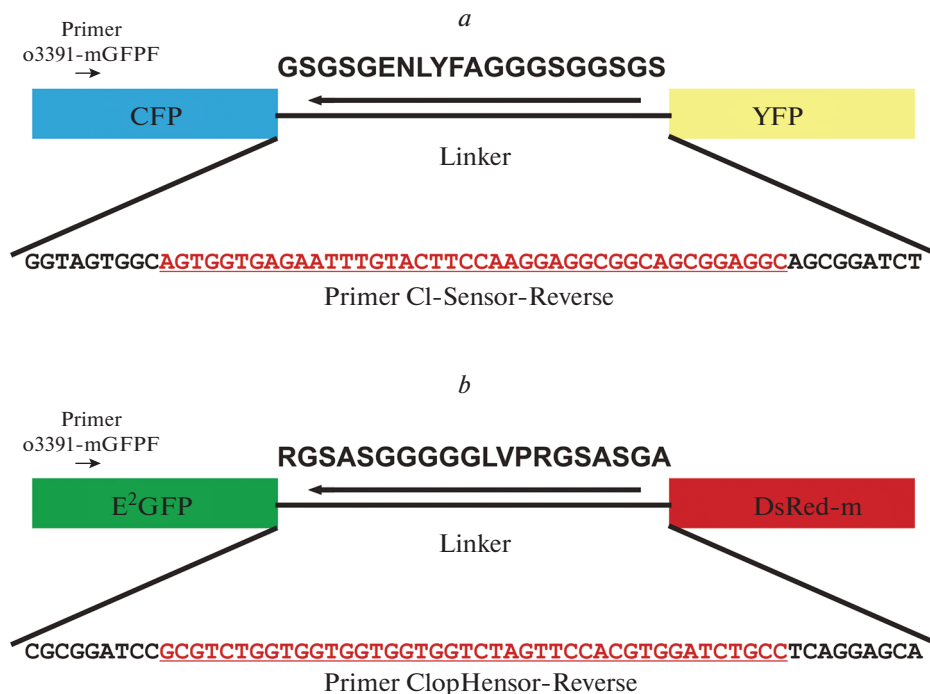


Рис. 1. Схема генетических конструкций экспрессируемых в нейронах трансгенных мышей: *a* – CI-Sensor; *b* – ClorHensor. Стрелками указана локализация сайтов отжига праймеров (без соблюдения масштаба). Последовательности сайтов отжига обратных праймеров выделены красным шрифтом.

(рис. 1b). В данной конструкции E²GFP является сенсором хлора, а DsRed-m – референтным белком, применяемым для ратиометрических измерений pH и концентрации ионов хлора в цитоплазме [17, 21].

Регистрация хлор-специфичного сигнала осуществляется путем расчета отношения интенсивности эмиссии при облучении сенсора светом с длиной волны 458 нм (изобестическая точка, в которой пересекаются спектры возбуждения при различных значениях pH) к интенсивности эмиссии при облучении светом с длиной волны более 560 нм (референтному диапазону красного флуоресцентного белка). Наличие изобестической точки pH при 458 нм обеспечивает одновременную регистрацию двух ионов (Cl[−] и H⁺).

Спектр возбуждения ClorHensor имеет два заметных пика с максимумами около 515 и 560 нм, соответствующие E²GFP и DsRed-m [17]. В целом, спектральные изменения ClorHensor идеально подходят для ратиометрической работы в трех диапазонах длин волн возбуждения: ≈458, 490–510 и 560–590 нм.

Линии мышей были получены с использованием нейронального промотора Thy1, который стимулирует устойчивую экспрессию в различных типах нейронов центральной нервной системы [24–26], следуя процедурам, которые описаны ранее [15, 16]. Для получения линий мышей, экспрессирующих CI-Sensor и ClorHensor использовали штамм лабораторных мышей C57BL/6.

Все процедуры с животными одобрены локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета (№ 10; 20.12.2016). Животные

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения генотипирования трансгенных мышей линий “Cl-Sensor” и “ClopHensor” методом ПЦР

Шифр праймера	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Длина, нуклеотиды
o3391-mGFPF	ccctgaagttcatctgcacc	20
Cl-Sensor-Reverse	gcctccgctgccgcctccttgaagtacaaattctcaccact	42
ClopHensor-Reverse	ggcagatccacgtggaactagaccaccaccaccagacgc	42

содержались при естественном освещении и температуре воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$ с постоянным доступом к комбинированному корму и воде.

ПЦР анализ смешанной популяции трансгенных мышей

Для выделения ДНК использовали фрагменты ушей и хвостов длиной 3–5 мм, которые хранили при температуре -20°C . Выделение общей ДНК проводили с использованием набора реагентов “QIAamp DNA MiniKit” (Qiagen, Германия) согласно рекомендациям производителя. Определение концентрации выделенной ДНК проводили с помощью бескуветного спектрофотометра NanoDropND-1000 (ThermoFisherScientific, США).

Для проведения генотипирования особей был использован метод ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. В качестве прямого праймера был использован праймер o3391-mGFPF [16] и рассчитаны последовательности обратных праймеров для ПЦР, соответствующие линкерным участкам генетических конструкторов (табл. 1).

ПЦР проводили с использованием реакционной смеси “ScreenMix” (Евроген, Россия) на термоциклере C1000 (Bio-Rad, США). Для проведения ПЦР готовили реакционную смесь объемом 10 мкл состава: 5× ScreenMix – 2.0 мкл, прямой праймер (20 мкМ) – 0.1 мкл; обратный праймер (20 мкМ) – 0.1 мкл, препарат ДНК (7–20 нг) – 0.3 мкл; H_2O – 7.5 мкл.

После ряда этапов оптимизации ПЦР-амплификацию проводили по следующей программе: 1) 94°C – 2 мин; 2) 35 циклов: 94°C – 30 с; 55°C – 30 с; 72°C – 45 с; 3) 72°C – 5 мин; 4) 10°C – ∞.

Продукты ПЦР-амплификации разделяли методом гель-электрофореза в 1.0%-ном агарозном геле с использованием электрофорезной горизонтальной системы Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, США) и документировали с помощью системы мультиплексной визуализации GelDoc XR+ (Bio-Rad, США).

Приготовление переживающих срезов мозга и их визуализация

Анестезированных изофлураном мышей декапитировали, головной мозг извлекали и помещали в ледяной раствор с высоким содержанием калия следующего состава: 120 мМ К-глюконат, 10 мМ HEPES-acid, 15 мМ Na-глюконат, 0.2 мМ EGTA и 4 мМ NaCl (pH 7.2, 290–300 мОсм/л). По истечении одной минуты выделяли большие полушария головного мозга и монтировали для приготовления сагиттальных срезов (350 мкм) на моторизованном вибротоме NVSLM (World Precision Instruments, США). Приготовление срезов осуществляли в ледяном растворе с высоким содержанием калия. Готовые срезы помещали на 20 мин в инкубационную камеру с раствором искусственной цереброспинальной жидкости (ACSF) с повышенным содержанием магния (в мМ): NaCl – 126; KCl 3.5; NaH_2PO_4 – 1.2; глюкоза 10; NaHCO_3 – 25; MgCl_2 – 10; CaCl_2 – 0.5 (pH 7.3–7.4 при постоянной оксигенации карбогеном; 290–300 мОсм/л, комнатная температура), после чего в течение как

минимум часа инкубировали в нормальном ACSF (в mM): NaCl — 126; KCl — 3.5; NaH_2PO_4 — 1.2; глюкоза — 10; NaHCO_3 — 25; MgCl_2 — 1.3; CaCl_2 — 2 (pH 7.3–7.4 при постоянной оксигенации карбогеном; 290–300 мОсм/л, комнатная температура).

Срезы визуализировали при помощи прямого флуоресцентного микроскопа Olympus BX51WI, оборудованного водно-иммерсионными объективами $\times 10$ и $\times 60$, видеокамерой iXon Life 897 EMCCD (Andor, Oxford Instruments, Великобритания), четырехканальным светодиодным источником света (LED4D001, Thorlabs, США), 4-канальным драйвером для светодиодов (DC4100, Thorlabs, США) и набором четырехполосных фильтров (Chroma, Foothill Ranch, США). Управление компонентами установки осуществляли при помощи программного обеспечения Micro-Manager [18] или DriverLed (Казанский государственный медицинский университет, Казань). Эмиссию флуоресцентных белков в составе сенсоров индуцировали путем облучения светом с длинами волн 455, 505 и 590 нм. Экспозиция съемки при получении изображений составляла от 30 до 500 мс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разделение линий с помощью ПЦР-анализа

Всего были выделены ДНК от 227 особей трансгенных мышей. Концентрация выделенной ДНК составила 25–77 нг/мкл. Для всех выделенных ДНК была проведена ПЦР-амплификация целевого участка генома с целью генотипирования особей трансгенных мышей.

В результате ПЦР-амплификации были получены продукты длиной приблизительно 650–700 пар нуклеотидов (пн), что близко к ожидаемой длине 644 и 638 пн для “Cl-Sensor” и “ClopHensor” соответственно. Примеры результатов разделения продуктов ПЦР-амплификации участков ДНК некоторых особей трансгенных мышей представлены на рис. 2 и 3.

ПЦР-продукт, соответствующий ожидаемому для генетически чистой линии “ClopHensor”, образовался у образцов а-2, а-4, а-7, а-8, а-9. У образцов а-41, а-42, а-43, а-44, а-24 образовались ПЦР-продукты, соответствующие линиям “ClopHensor” и “Cl-Sensor”, т.е. эти особи являются носителями гибридных геномов (рис. 2).

ПЦР-продукт, соответствующий ожидаемому для генетически чистой линии “Cl-Sensor”, образовался у образцов а-100, а-105 — а-109, а-112, а-113, а-115. У образцов а-96, а-95 — а-99, а-114, а-116 образовались ПЦР-продукты, соответствующие линиям “ClopHensor” и “Cl-Sensor”, т.е. эти особи являются носителями гибридных геномов (рис. 3).

Проверка надежности разделения линий трансгенных мышей

Для дополнительной проверки надежности результатов генотипирования линий было использовано два подхода: (i) случайное секвенирование ПЦР-продуктов и (ii) визуализация флуоресцентных сигналов в срезах мозга.

Для валидации результатов генотипирования в Междисциплинарном центре протеомных исследований КФУ на секвенаторе ABI PRISM 310 с использованием набора реагентов “Big Dye Terminator 3.1 sequencing kit” (ABI, США) было проведено случайное секвенирование по Сэнгеру ПЦР-продуктов, полученных от 6 особей, идентифицированных, как относящихся к линиям “Cl-Sensor” и “ClopHensor”. Для секвенирования были использованы праймеры o3391-mGFPP и o3392-mGFPR [16]. Результаты, полученные методом секвенирования, во всех случаях совпали с результатами генотипирования методом ПЦР-анализа (рис. 4).

Также с применением методов флуоресцентной микроскопии была проведена визуализация экспрессии сенсоров в нейронах срезов гиппокампа мышей геноти-

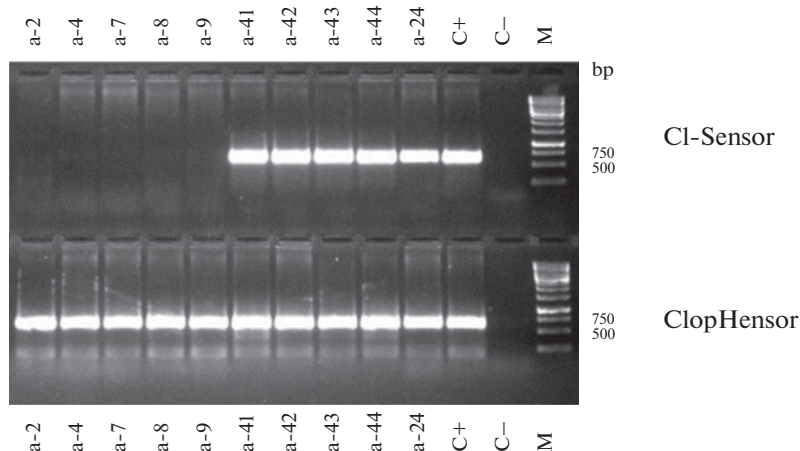


Рис. 2. Электрофореграмма результатов разделения с использованием детекции ПЦР-продуктов методом гель-электрофореза: а-2—а-24 — номера образцов, С+ — положительный контроль, С— — отрицательный контроль, М — маркер длин фрагментов ДНК (GeneRuler 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США)).

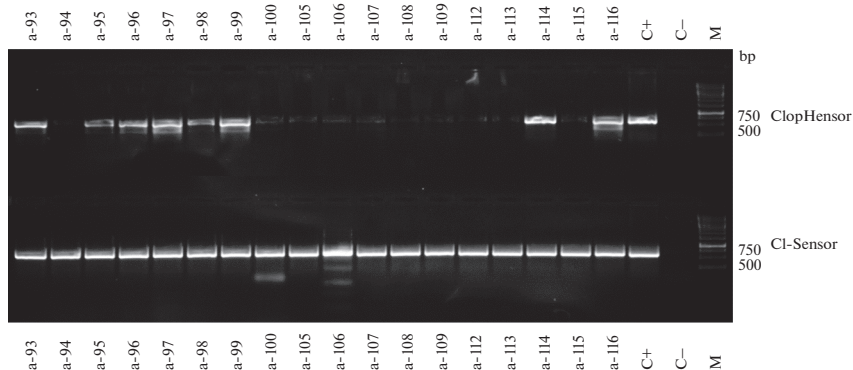


Рис. 3. Электрофореграмма результатов разделения с использованием детекции ПЦР-продуктов методом гель-электрофореза: а-93—а-116 — номера образцов, С+ — положительный контроль, С— — отрицательный контроль, М — маркер длин фрагментов ДНК (GeneRuler 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США)).

пированных особей. Принципиальным отличием линий мышей, экспрессирующих “ClonHensor”, является наличие белка DsRed-m, светящегося в красном диапазоне длин волн, в то время как при более коротких длинах волн флуоресцентные сигналы пересекаются. Поэтому проводилась регистрация хлор- и рН-специфичных сигналов, появляющихся при последовательном облучении срезов возбуждающим светом со следующими длинами волн: 590, 505 и 455 нм [19]. На рис. 5 представлены микрофотографии переживающих срезов мозга мыши линии “ClonHensor” на уровне CA1 зоны гиппокампа. Сенсор визуализируется на всех трех каналах.

Majority	AGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGCACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGCGATCGACTTCAAGGAGGAC
	10 20 30 40 50 60 70 80
constuct ClopHensor	
a-17	
a-20	
construct CI-sensor	
a-47	
a-48	
a-49	
a-50	
Majority	GGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACACGCTCTATATCAGCGCCGACAAGCAGAAGAACGG
	90 100 110 120 130 140 150 160
constuct ClopHensor	A.....TG.....
a-17	A.....TG.....
a-20	A.....TG.....
construct CI-sensor	
a-47	
a-48	
a-49	
a-50	
Majority	CATCAAGGCGCACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCTACCAGCAGAACACCC
	170 180 190 200 210 220 230 240
constuct ClopHensor	TG.....
a-17	TG.....
a-20	TG.....
construct CI-sensor	
a-47	
a-48	
a-49	
a-50	
Majority	CCATCGGGCGACGGCCCGTCTGCTGCGCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG
	250 260 270 280 290 300 310 320
constuct ClopHensor	TA.....
a-17	TA.....
a-20	TA.....
construct CI-sensor	
a-47	
a-48	
a-49	
a-50	
Majority	AAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGG
	330 340 350 360 370 380 390 400
constuct ClopHensor	CG.....
a-17	CG.....
a-20	CG.....
construct CI-sensor	
a-47	
a-48	
a-49	
a-50	
Majority	AGGTAGTGGCAGTGGTGAGAATT-TGTACTTCCAAGGAG
	410 420 430
constuct ClopHensor	TCCGCGTCTG.....GTGG.GG.C..G.....C.TG.
a-17	TCCGCGTCTG.....GTGG.GG.C..G.....C.TG.
a-20	TCCGCGTCTG.....GTGG.GG.C..G.....C.TG.
construct CI-sensor	
a-47	
a-48	
a-49	
a-50	

Рис. 4. Нуклеотидные последовательности секвенированного участка генома мышей линий “CI-Sensor” и “ClopHensor” и соответствующих генетических конструкций: a-17, a-20, a-47, a-48, a-49, a-50 — образцы.

Поскольку CI-Sensor, состоящий из цианового флуоресцентного белка и модифицированного желтого флуоресцентного белка, не обладает эмиссией в красной области спектра, чистота трансгенной линии “CI-Sensor” была подтверждена отсутствием флуоресцентного сигнала при возбуждении волнами света длиной 590 нм и одновременным наличием флуоресценции на каналах 505 и 455 нм (рис. 5).

Следовательно, мыши, идентифицированные по результатам генотипирования как относящиеся к линиям “CI-Sensor” или “ClopHensor”, продемонстрировали соответствующие спектры флуоресценции в нейронах головного мозга.

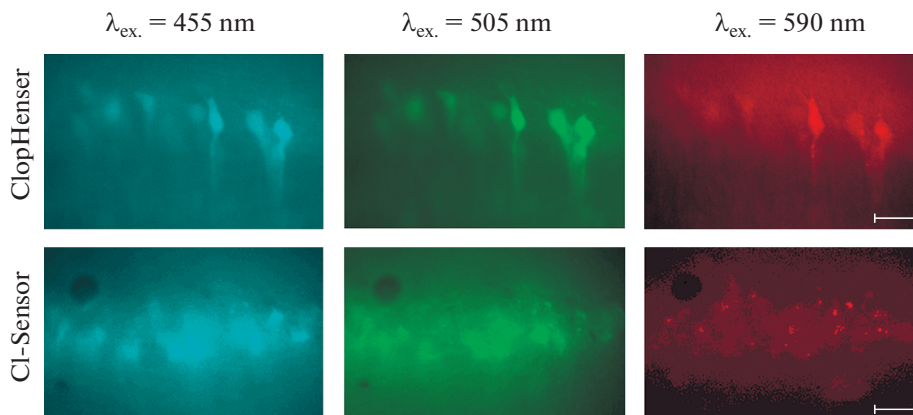


Рис. 5. Микрофотографии переживающих срезов мозга на уровне CA1 зоны гиппокампа, полученных от мыши, экспрессирующей ClorHenser (возраст — 6 дней) и мыши, экспрессирующей Cl-Sensor (возраст — 5 мес.). Эмиссию регистрировали при облучении препаратов возбуждающим светом со следующими длинами волн: 455, 505 и 590 нм. У мышей, экспрессирующих Cl-Sensor, отсутствует специфичная для ClorHenser эмиссия в красной части спектра. Масштабная линейка — 25 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Главной платформой для моделирования заболеваний человека в биомедицинских исследованиях являются грызуны, прежде всего трансгенные мыши [28, 30, 32]. Благодаря секвенированию генома этого вида животных, появилась возможность создавать линии трансгенных мышей со встроенными или удаленными генетически белками, или другими генетически кодируемыми молекулами [2, 27, 31]. Были созданы тысячи генетически модифицированных трансгенных линий мышей, в частности экспрессирующих конструкции, основанные на разных вариантах зеленого флуоресцентного белка [29, 36–38] и биосенсоры [15, 16, 33, 34].

Разведение и содержание генетически модифицированных мышей требует точного и тщательного контроля генетической чистоты линий. Особые условия содержания могут быть важны, в зависимости от характера мутаций. Например, мышей с ослабленным иммунитетом необходимо содержать в строгих условиях, свободных от специфических патогенов, предпочтительно в барьерном помещении [39]. Неожиданные проблемы с разведением и поддержанием чистоты линий животных могут возникнуть несмотря на все усилия по созданию подходящих и специфичных условий разведения и содержания. Диагностировать проблему сложно, так как она, вероятно, является результатом сочетания ряда факторов, таких как мутационные/трансгенные эффекты, факторы окружающей среды, острые или хронические заболевания [40].

Часто генетическим фоном выбора для содержания генетически модифицированных мышей является C57BL/6. Тем не менее, может быть необходимо или даже предпочтительно поддерживать трансгенную линию на другом гибридном фоне, чтобы облегчить проблемы размножения или справиться с поддержанием популяции.

Как указывалось, ряд спонтанных процессов в геноме трансгенных особей, а также обстоятельства, связанные с человеческим фактором, могут приводить к появлению в популяции особей с геномом, отличающимся от гомозиготного генома исходных линий. Поэтому постоянный контроль за генетической чистотой линий является абсолютно необходимым. Проведение такого контроля представляется

особенно важным в случае одновременного поддержания линий, содержащими близкие генетические конструкции. Поэтому важной задачей является выбор метода генотипирования, позволяющего быстро и надежно различать особей с близкими, но разными генотипами. При этом желательно также, чтобы метод отличался простотой и дешевизной.

В настоящее время для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов широко используется метод аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР), позволяющий различать аллели гена, отличающиеся на один нуклеотид, и дающий возможность легкого определения гомо- и гетерозигот. Ранее этот метод был использован нами для определения генотипа по мутации 1911A > G в гене *TRPV1* человека [41]. Поскольку основной сложностью задачи нашего исследования было различение гомо- и гетерозиготных особей, то для генотипирования особей линий “Cl-Sensor” и “ClorHensor” был выбран метод ПЦР в его модификации, аналогичной АС-ПЦР. Выбор метода был связан, в первую очередь, с его эффективностью и достоверностью результатов генотипирования. Немаловажными преимуществами выбранного метода является также относительная дешевизна реагентов и оборудования, достаточно высокая производительность, быстрота определения и отсутствие необходимости в высокой квалификации персонала.

Для проведения ПЦР нами были рассчитаны последовательности обратных праймеров, соответствующие нуклеотидной последовательности линкерных участков генетических конструкторов “Cl-Sensor” и “ClorHensor” (рис. 1 и табл. 1). Значение идентичности нуклеотидной последовательности линкеров этих конструкторов составило 56%, что позволило достичь достаточной специфичности при проведении ПЦР, подтвержденной результатами секвенирования (рис. 4).

Основным недостатком выбранного метода является возможное получение ложноположительных результатов ПЦР. Для уменьшения их количества и достижения в перспективе 100%-ной специфичности ПЦР было проведено несколько этапов оптимизации реакции, в ходе которых были подобраны оптимальные температура отжига и количество циклов амплификации, позволяющие достичь достаточной достоверности результатов. Тем не менее, в ходе дальнейшей оптимизации мы планируем достичь полного исключения ложноположительных результатов тестирования.

Таким образом, разработанная тест-система обеспечила достаточную достоверность результатов генотипирования и может быть использована как для разделения особей трансгенных мышей линий “Cl-Sensor” и “ClorHensor” и их гибридов, так и для проведения генетического контроля при поддержании этих линий. Вероятно, аналоги разработанной тест-системы могут быть использованы и для выполнения таких же задач для других линий трансгенных мышей с малоразличающимися по нуклеотидной последовательности генетическими конструкторами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная тест-система для генотипирования трансгенных мышей линий “Cl-Sensor” и “ClorHensor” характеризуется высокой достоверностью результатов и может быть использована для проведения дальнейшего контроля за генетической чистотой линий, а также контроля линий животных с участками, незначительно различающимися по нуклеотидной последовательности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках проекта РНФ № 18-15-00313 “Разработка фотофармакологических подходов для коррекции тормозных процессов в центральной нервной системе

при неврологических заболеваниях”, а также в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (Ю.Н.Д., П.Д.Б.), сбор данных (А.Х.Ю., Е.О.П.), обработка данных (Ю.Н.Д., А.Х.Ю.), написание статьи и редактирование текста (Ю.Н.Д., А.Х.Ю., Е.О.П., П.Д.Б.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Asrican B, Augustine GJ, Berglund K, Chen S, Chow N, Deisseroth K, Feng G, Gloss B, Hira R, Hoffmann C, Kasai H* (2013) Next-generation transgenic mice for optogenetic analysis of neural circuits. *Front Neural Circuits* 7: 160.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00160>
2. *Ting JT, Feng G* (2013) Development of transgenic animals for optogenetic manipulation of mammalian nervous system function: progress and prospects for behavioral neuroscience. *Behav Brain Res* 255: 3–18.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.037>
3. *Partridge JG* (2015) Utilizing GCaMP transgenic mice to monitor endogenous $G_q/11$ -coupled receptors. *Front Pharmacol* 6: 42.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00042>
4. *Almeida JL, Dakic A, Kindig K, Kone M, Letham DLD, Langdon S, Peat R, Holding-Pillai J, Hall EM, Ladd M, Shaffer MD, Berg H, Li J, Wigger G, Lund S, Steffen CR, Fransway BB, Geraghty B, Natoli M, Bauer B, Gollin SM, Lewis DW, Reid Y* (2019) Interlaboratory study to validate a STR profiling method for intraspecies identification of mouse cell lines. *PLoS One* 14(6): e0218412.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218412>
5. *Silva AJ, Simpson EM, Takahashi JS, Lipp HP, Nakanishi S, Wehner JM, Giese KP, Tully T, Abel T, Chapman PF, Fox K* (1997) Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Neuron* 19(4): 755–759.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80958-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80958-7)
6. *Haruyama N, Cho A, Kulkarni AB* (2009) Overview: engineering transgenic constructs and mice. *Current Protocol Cell Biol* 42: 19.10.1–19.10.9.
<https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1910s42>
7. *Benavides F, Rülcke T, Prins J-B, Bussell J, Scavizzi F, Cinelli P, Herault Y, Wedekind D* (2020) Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report 54(2): 135–148.
<https://doi.org/10.1177/0023677219867719>
8. *Linder CC* (2003) Mouse nomenclature and maintenance of genetically engineered mice. *Compar Med* 53(2): 119–125.
9. *Almeida JL, Hill CR, Cole KD* (2014) Mouse cell line authentication. *Cytotechnology* 66: 133–147.
<https://doi.org/10.1007/s10616-013-9545-7>
10. *Lusis AJ, Yu J, Wang SS* (2007) The Problem of Passenger Genes in Transgenic Mice. *Am Heart Assoc* 27: 2100–2103.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147918>
11. *Dennis MB* (2002) Welfare issues of genetically modified animals. *ILAR J* 43(2): 100–109.
<https://doi.org/10.1093/ilar.43.2.100>
12. *Wolfer DP, Crusio WE and Lipp HP* (2002) Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci* 25(7): 336–340.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02192-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02192-6)
13. *Costinean S, Zanasi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM* (2006) Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in Eμ-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18): 7024–7029.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602266103>
14. *Takada T, Awaji T, Itoh K, Takahashi R, Shibui A, Yoshida K, Sugano S, Tsujimoto G* (1997) Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nature Biotechnol* 15(5): 458–461.
<https://doi.org/10.1038/nbt0597-458>

15. *Batti L, Mukhtarov M, Audero E, Ivanov A, Paolicelli RC, Zurborg S, Gross C, Bregestovski P, Heppenstall PA* (2013) Transgenic mouse lines for non-invasive ratiometric monitoring of intracellular chloride. *Front Mol Neurosci* 6: 11.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00011>
16. *Diuba AV, Samigullin DV, Kaszas A, Zonfrillo F, Malkov A, Petukhova E, Casini A, Arosio D, Escalapez M, Gross CT, Bregestovski P* (2020) CLARITY analysis of the Cl/pH sensor expression in the brain of transgenic mice. *Neuroscience* 439: 181–194.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.010>
17. *Bregestovski P, Arosio D* (2011) Green Fluorescent Protein-Based Chloride Ion Sensors for In Vivo Imaging. In: Jung G (eds) *Fluorescent Proteins II*. Springer Series on Fluorescence 12 Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/4243_2011_27
18. *Edelstein AD, Tsuchida MA, Amodaj N, Pinkard H, Vale RD* (2014) Advanced methods of microscope control using µManager software. *J Biol Methods* 1(2): 1–10.
<https://doi.org/10.14440/jbm.2014.36>
19. *Ponomareva D, Petukhova E, Bregestovski P* (2021) Simultaneous Monitoring of pH and Chloride (Cl⁻) in Brain Slices of Transgenic Mice. *Int J Mol Sci* 22(24): 13601.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413601>
20. *Markova O, Mukhtarov M, Real E, Jacob Y, Bregestovski P* (2008) Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. *J Neurosci Methods* 170(1): 67–76.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.12.016>
21. *Arosio D, Ricci F, Marchetti L, Gualdani R, Albertazzi L, Beltram F* (2010) Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. *Nature Methods* 7(7): 516–518.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1471>
22. *Mukhtarov M, Markova O, Real E, Jacob Y, Buldakova S and Bregestovski P* (2008) Monitoring of chloride and activity of glycine receptor channels using genetically encoded fluorescent sensors. *Philosoph Transact Royal Soc A: Mathemat Physical Engineer Sci* 366(1880): 3445–3462.
<https://doi.org/10.1098/rsta.2008.0133>
23. *Waseem T, Mukhtarov M, Buldakova S, Medina I, Bregestovski P* (2010) Genetically encoded Cl⁻ Sensor as a tool for monitoring of Cl⁻-dependent processes in small neuronal compartments. *J Neurosci Methods* 193(1): 14–23.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.08.002>
24. *Caroni P* (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71(1): 3–9.
[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00121-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00121-5)
25. *Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G* (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54(2): 205–218.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.005>
26. *Berglund K, Schleich W, Wang H, Feng G, Hall WC, Kuner T, Augustine GJ* (2008) Imaging synaptic inhibition throughout the brain via genetically targeted Clomeleon. *Brain Cell Biol* 36: 101–118.
<https://doi.org/10.1007/s11068-008-9031-x>
27. *Bradley A* (2002) Mining the mouse genome. *Nature* 420: 512–514.
<https://doi.org/10.1038/420512a>
28. *Zhang Z, Carriero N, Gerstein M* (2004) Comparative analysis of processed pseudogenes in the mouse and human genomes. *Trends Genetics* 20(2): 62–67.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.12.005>
29. *Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR* (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28(1): 41–51.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00084-2)
30. *Bryan KJ, Lee HG, Perry G, Smith MA, Casadesus G* (2011) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: behavioral testing and considerations. *Front Neurosci* 2(1).
31. *Yang XW, Gong S* (2005) An overview on the generation of BAC transgenic mice for neuroscience research. *Current Protocols Neurosci* 31(1): 5–20.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0520s31>
32. *Navabpour S, Kwapis JL, Jarome TJ* (2020) A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neurosci Biobehav Rev* 108: 732–748.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.013>
33. *Kamioka Y, Sumiyama K, Mizuno R, Sakai Y, Hirata E, Kiyokawa E, Matsuda M* (2012) Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors. *Cell Struct Funct* 37(1): 65–73.
<https://doi.org/10.1247/csf.11045>

34. *Halls ML, Canals M* (2018) Genetically encoded FRET biosensors to illuminate compartmentalised GPCR signalling. *Trends Pharmacol Sci* 39(2): 148–157.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.09.005>
35. *Gong B, Kielar C, Morton AJ* (2012) Temporal separation of aggregation and ubiquitination during early inclusion formation in transgenic mice carrying the Huntington's disease mutation. *PLoS One* 7(7): e41450.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041450>
36. *Vázquez-Chona FR, Clark AM, Levine EM* (2009) Rbp1 promoter drives robust Müller glial GFP expression in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 50(8): 3996–4003.
<https://doi.org/10.1167/iovs.08-3189>
37. *Bridge KE, Berg N, Adalbert R, Babetto E, Dias T, Spillantini MG, Ribchester RR, Coleman MP* (2009) Late onset distal axonal swelling in YFP-H transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30(2): 309–321.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.002>
38. *Taylor-Clark TE, Wu KY, Thompson JA, Yang K, Bahia PK, Ajmo JM* (2015) Thy1. 2 YFP-16 transgenic mouse labels a subset of large-diameter sensory neurons that lack TRPV1 expression. *PLoS One* 10(3): e0119538.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119538>
39. *Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE* (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68(5): 869–877.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90030-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90030-G)
40. *Suckow MA, Danneman P, Brayton C* (2001) The laboratory mouse. CRC Press Inc 1(1).
<https://doi.org/10.1201/9780849376276>
41. *Yakubova A, Davidyuk Y, Tohka J, Khayrutdinova O, Kudryavtsev I, Nurkhametova D, Kamshilin A, Giniatullin R, Rizvanov A* (2021) Searching for Predictors of Migraine Chronification: a Pilot Study of 1911A > G Polymorphism of TRPV1 Gene in Episodic Versus Chronic Migraine. *J Mol Neurosci* 71: 618–624.
<https://doi.org/10.1007/s12031-020-01683-9>
42. *Casola S* (2010). Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. In: *MicroRNAs and the Immune System*. Humana Press. Totowa. 145–163.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-811-9_10

A Test System for Monitoring the Genetic Purity of Transgenic Mice Lines Expressing Chloride and Hydrogen Biosensors

Y. N. Davidyuk^{a, *}, A. Kh. Yusupova^b, E. O. Petukhova^{a, b}, and P. D. Bregestovski^{b, c, **}

^a*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia*

^b*Institute of Neurosciences, Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

^c*Institut de Neurosciences des Systemes, Aix-Marseille University, INSERM, INS, Marseille, France*

*e-mail: davi.djuk@mail.ru

**e-mail: pbreges@gmail.com

Models with genetic manipulation of animals have been widely used in various fields of medicine and biological research. Thousands of genetically modified transgenic mouse models have been created in recent decades and their production is accelerating. Therefore, an urgent problem is the maintenance and control of the genetic purity of the transgenic mice lines. Our research uses lines of transgenic mice expressing genetically encoded probes in neurons for noninvasive monitoring of chloride ions (“Cl-Sensor”) and simultaneous registration of chloride and hydrogen (“ClopHensor”). To maintain the purity of these lines, we have developed a test system for genotyping transgenic mice. The approach is characterized by high reliability of the results and can be used for further control of the genetic purity of these lines, as well as control of animal lines with slightly different parts of amino acid sequences.

Keywords: transgenic lines, chloride and hydrogen sensors, genetic control, PCR