

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации

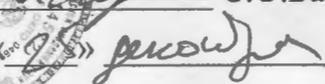
Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН,

 С.О.Бачурин

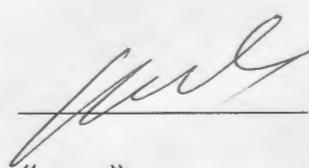
«» 2015 г.



**«МЕТОДИКА КОНТРОЛЯ РЕКОМБИНАЦИИ В ГЕНОМЕ, АКТИВИРОВАННОЙ
ТАМОКСИФЕНОМ, ПУТЕМ АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ РЕФЕРНОГО ГЕНА (БЕТА
ГАЛАКТОЗИДАЗЫ) В ЛОКУСЕ ROSA НА ШЕСТОЙ ХРОМОСОМЕ»**

СТП-14.621.21.0008.14-2015

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.

 С.Г. Ключков

«» 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	3
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	5
7.3. Оборудование	5
8. Операции, связанные с выполнением данной методики	5
8.2 Конвенционная ПЦР	7
8.3 Анализ ДНК в агарозном геле	7
8.3 Получение срезов и гистохимическое окрашивание	8
8.4 Получение микрофотографий	9
9. Обработка и оформление результатов измерений	10
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды	10
11. Требования к квалификации операторов	10

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.14-2015 устанавливает методику «Методика контроля рекомбинации в геноме, активированной тамоксифеном, путем анализа активности реферного гена (бета галактозидазы) в локусе ROSA на шестой хромосоме.»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуры, выполнение которых необходимо для оценки контроля рекомбинации в геноме, активированной тамоксифеном. Основными областями применения данной методики являются биологические и медицинские науки (контроль индуцированной рекомбинации в геноме 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. Фосфатный Солевой буфер (PBS):

- 77 mM гидрофосфат натрия (Sigma Aldrich, Германия)
 - 23 mM дигидрофосфат натрия (Sigma Aldrich, Германия)
 - 1,5 M хлорид натрия; pH=7,2 (Sigma Aldrich, Германия)
- Довести объем dH₂O до 500 ml

2. Парафармальдегид (ПФА) (Sigma Aldrich, Германия)

3. Буффер для отмывки

- 0.4 ml 1 M MgCl₂ (Sigma Aldrich, Германия)
- 2.0 ml 1% деоксихолат (Sigma Aldrich, Германия)
- 2.0 ml 2% NP-40 (Sigma Aldrich, Германия)
- 195.6 ml 0.1 M фосфат натрия, pH 7.3

4. Стоковый раствор X-gal

- 250 mg X-gal (5-бромо-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид (Sigma Aldrich, Германия)
- 10 диметил формамид (Sigma Aldrich, Германия)

5. Рабочий раствор X-gal

- 2.0 ml 25 mg/ml стокового раствора X-gal
- 0.106 g ферроцианид калия (Sigma Aldrich, Германия)
- 0.082 g феррицианид калия (Sigma Aldrich, Германия)
- 48.0 ml буффер для отмывки

6. 100% этиловый спирт.

7. Парафармальдегид (ПФА) (Sigma Aldrich, Германия)
8. Хлороформ (ACROS Organics, США)
9. Парафин (Leica Biosystems, Германия)
10. DPX (BDH, Великобритания).
11. Фенол (Sigma Aldrich, Германия)
12. Авертин (Sigma Aldrich, Германия)

7.2. Материалы

1. Предметные стекла, покрытые поли L-лизинном (Menzel, Германия)
2. Микротомные лезвия Leica DB80 LS (Leica Biosystems, Германия)

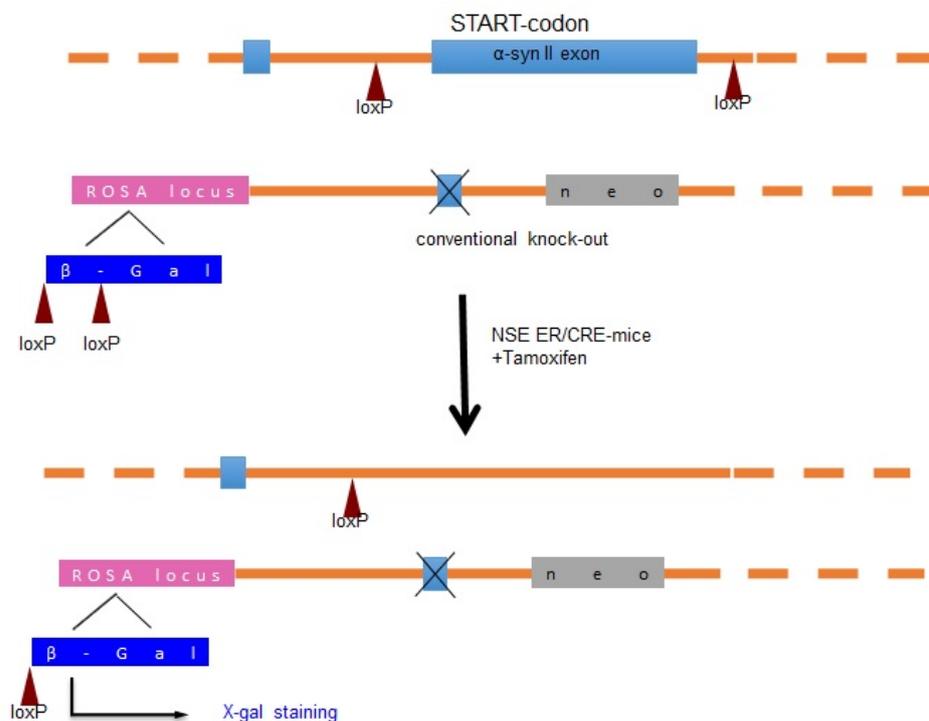
7.3. Оборудование

1. Станция для заливки Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия)
2. Ротационный микротом Leica RM2265 (Leica Biosystems, Германия)
3. Хирургические инструменты (Dimeda, Германия):
 - хирургические ножницы (2 шт),
 - пинцет с тупым наконечником (2 шт),
 - пинцет с острым наконечником.
4. Микроскоп Leica DMI 4000B (Leica Microsystems, Швейцария)
5. Фотокамера Leica DFS 490 (Leica Microsystems, Швейцария)
6. Амплификатор Mastercycler nexus (Eppendorf AG, Германия).

8. Операции, связанные с выполнением данной методики

Для анализа корректности рекомбинации генома коровой линии после активированной тамоксифеном делеции фланкированного Lox-P сайтами участка ДНК, была проведена работа по скрещиванию мышей коровой линии (Snca flox(neo-)/flox(neo-)) с мышами вспомогательной трансгенной линии Act-Cre-Res. В данной линии трансгенная кассета находится под промотором гена актина, что позволяет осуществлять рекомбинацию во всех типах клеток,

начиная с самых ранних эмбриональных стадий развития. Инициация рекомбинации не требует химической индукции. Данная методика позволяет осуществлять проверку корректности проведенных нами в геноме мыши модификаций для Cre-рекомбинации и осуществлять проверку принципиальной возможности Cre-рекомбинации в геноме созданной коровой линии всеми, в том числе и регулируемые Cre-рекомбиназами. Помимо трансгенной кассеты в геноме данной вспомогательной линии содержалась геномная модификация на 6й хромосоме в области локуса ROSA26 (Rosa26-stop-lacZ reporter, Soriano, 1999). Модификация локуса была проведена таким образом, что в геном мыши оказался включен бактериальный ген бета-галактозидазы, под Lac-Z промотором, который инактивирован Lox-P сайтами. Регулируемая Cre-рекомбинация приводит к активации гена и продукции бета-галактозидазы. Была разработана методика для контроля рекомбинации в геноме, активированной тамоксифеном, путем анализа активности реферного гена в локусе ROSA26 по интенсивности гистохимического окрашивания препаратов бета-галктозидазой (betaGal) в присутствии субстрата X-GAL.



8.2 Конвенционная ПЦР

Генотипирование животных проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием следующих праймеров:

mRosaFor	ATTGCTTGTGATCCGCCTCGGAGT
mRosaRev1	AGAGGCATTCATGGGAGTGGAAG
mRosaInsRev1	CTTTTACTGGCCTGCTCCCTTATC

ДНК выделяли с использованием фенол-хлороформного метода

Детекцию трансгенной кассеты в геномной ДНК проводили методом ПЦР на амплификаторе Mastercycler nexus (Eppendorf AG, Германия). Реакцию проводили в объеме 25 мкл в буфере, содержащем: 300 мМ Трис-НСl рН 8.0, 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 25 мМ MgCl₂; дНТФ в концентрации 0,2 мМ. Конечная концентрация праймеров составляла 0,5 мкМ каждый. В качестве матрицы использовали 1 мкл ДНК. В реакционную смесь добавляли 1,25 ед. Таq-полимеразы (Fermentas, США). Программа для ПЦР включала первичную денатурацию (2 мин при 94°C), затем 45 циклов: 15 сек при 94°C, 30 сек при 64.1°C и 40 сек при 72°C.

8.3 Анализ ДНК в агарозном геле

Электрофорез проводили в 2% агарозном геле в буфере ТАЕ, содержащем 40 мМ Трис-НСl, 20 мМ уксусной кислоты и 1 мМ EDTA, с добавлением бромистого этидия до концентрации 0,5 мкг/мл в приборе BioRad (США). К пробам перед нанесением добавляли по 3 мкл буфера для нанесения, содержащем 5% глицерина, 0,025% BFS, 0,2% 50x ТАЕ) на каждые 25 мкл образца. В качестве маркера для определения молекулярных весов фрагментов ДНК использовали ДНК-маркер GeneRuler 1 kb (Fermentas, США). Документацию электрофореграмм осуществляли с помощью прибора BioSpectrum AC Chemi HR 410 (UVP, США), после визуализации ДНК в проходящем ультрафиолетовом свете.

Размер амплифицированного фрагмента для животных дикого типа составлял 577bp, а для трансгенных животных 450bp

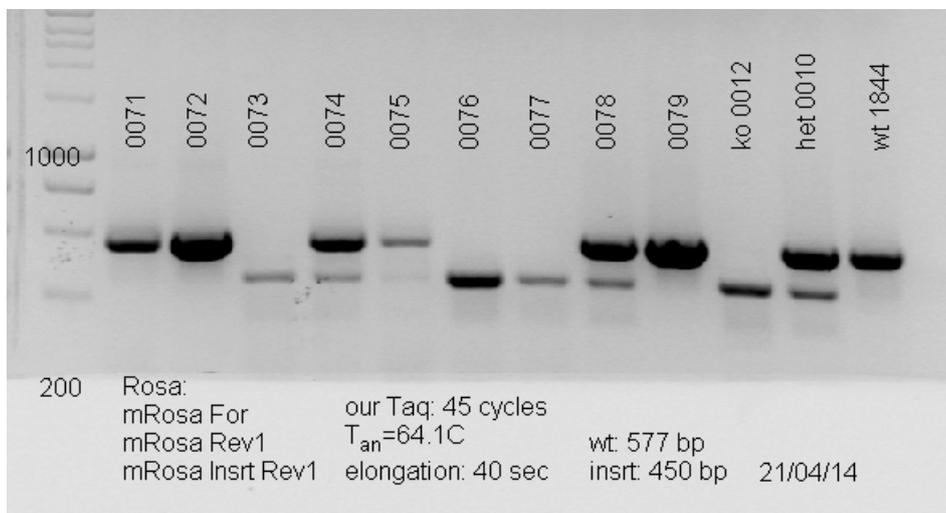


Рисунок 1 Визуализация ПЦР-фрагментов 1%-ном агарозном геле.

8.3 Получение срезов и гистохимическое окрашивание

Провести глубокую анестезию путем введения раствора авертина в дозе 0,5 мг/г веса внутривенно, после чего провести транскардиальную перфузию фосфатно-солевым буфером (ФСБ), затем – 4%-ным раствором параформальдегида (ПФА). Для дальнейших исследований извлечь головной и спинной мозг. Спинной мозг необходимо разделить на отделы: шейный, грудной и поясничный. Фиксацию тканей провести в 4%-ном ПФА в течение ночи. После отмывки от фиксирующего раствора провести дегидратацию тканей при комнатной температуре методом последовательного инкубирования в серии спиртов с повышением концентрации: 75% этиловом спирте – в течение ночи, 96% этаноле – 5 минут; 96% этаноле – 10 минут, 100% этаноле – 10 минут, 100% этаноле – 10 минут. Далее образцы поместить в смесь этанол-хлороформ (1:1) на 30 минут, затем в хлороформ на 1 час, после чего оставить на ночь в хлороформе. Насыщение тканей расплавленным парафином проводить при 60°C (3 смены по 1ч). Заключение в парафиновые блоки при помощи станции для заливки парафиновых блоков Leica EG1160

(Leica Biosystems, Германия). На ротационном микротоме Leica RM2265 (Leica Biosystems, Германия), получить срезы толщиной 8 мкм и монтировать на предметные стекла (Thermo Scientific, Великобритания).

Срезы депарафинизировать в ксилоле (20 мин) при постоянном перемешивании с последующей регидратацией в серии спиртов (этанол, при комнатной температуре) понижающейся концентрации (100, 95, 50%).

Срезы необходимо промыть буфером 3 раза, затем нанести на них рабочий раствор X-gal. Инкубировать в течение ночи при 37С. После этого снова промыть и провести дегидратацию срезов в серии спиртов (50, 95 и 100% этанол по 5 мин), проинкубировать срезы в ксилоле в течение 10 мин, заключить в синтетическую среду DPX (BDH, Великобритания).



Рисунок 2 X-gal окраска области Черной субстанции мозга мыши после активации тканеспецифической рекомбинации тамоксифеном

8.4 Получение микрофотографий

Детекцию осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 4000B (Leica Microsystems, Швейцария). Микрофотографии получены на фотокамере Leica DFS 490 (Leica Microsystems, Швейцария) с использованием программного обеспечения Leica Application Suit v. 2.8.1 (Leica Microsystems, Швейцария).

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