

УДК 577.218

ВЫБОР РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ В ГУБКЕ LUBOMIRSKIA BAICALENSIS

¹Кулакова Н.В., ²Болотова Т.А., ¹Ханаев И.В., ¹Черногор Л.И., ¹Беликов С.И.

¹ФГБУН «Лимнологический институт» Сибирского отделения РАН, Иркутск,
e-mail: info@lin.irk.ru;

²ФГБУН «Иркутский государственный университет», Иркутск, e-mail: dekanat@bio.isu.ru

Выбор оптимальных референсных генов для нормализации данных количественной ПЦР в режиме реального времени является критичным для получения корректных результатов. Поиск и анализ потенциальных референсных генов проведен на малоисследованном объекте – взрослых особях и примморфах эндемичной байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* с помощью программ NormFinder и BestKeeper. Из шести взятых в анализ генов: *actb*, *eef1A1*, *rp11*, *myo*, *lgalsl* и *pfn*, наиболее стабильная экспрессия отмечена для трех генов *actb*, *rp11* и *myo*. Выбранные референсные гены позволяют нормализовать данные количественной ПЦР для оценки изменения экспрессии генов в примморфах и взрослых губках *L. baicalensis*.

Ключевые слова: референсные гены, *Lubomirskia baicalensis*, NormFinder, BestKeeper

SELECTION OF REFERENCE GENES FOR QUANTITATIVE REAL-TIME PCR IN THE SPONGE LUBOMIRSKIA BAICALENSIS

¹Kulakova N.V., ²Bolotova T.A., ¹Khanaev I.V., ¹Chernogor L.I., ¹Belikov S.I.

¹Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk,
e-mail: info@lin.irk.ru;

²Irkutsk State University, Irkutsk, e-mail: dekanat@bio.isu.ru

Selection of optimal reference genes for normalization of real-time qPCR data is critical to obtain the correct results. Search and analysis of potential reference genes were carried on the scantily explored subjects – adults and primmorfs of endemic Baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis* by using NormFinder and BestKeeper programs. Out of the six genes taken in the analysis: *actb*, *eef1a1*, *rp11*, *myo*, *lgalsl*, and *pfn*, the most stable expression was shown for *actb*, *rp11*, and *myo*. Selected reference genes are useful for normalization of quantitative PCR data to assess gene expression changes in primmorfs and adult sponges *L. baicalensis*.

Keywords: reference genes, *Lubomirskia baicalensis*, primmorfs, NormFinder, BestKeeper

Количественная ПЦР в режиме реального времени является чувствительным, специфичным и простым методом для анализа экспрессии генов с помощью которого можно точно и быстро определять изменения уровня экспрессии интересующего гена в различных биологических образцах.

Одним из вариантов количественного анализа содержания транскриптов является их оценка и нормирование по отношению к референсным генам, которые амплифицируются в ПЦР одновременно с исследуемыми генами. Выбор наиболее стабильных референсных генов является важной задачей, так как по ним проводится нормирование данных, и недостаточная стабильность этих генов может существенно исказить результаты количественной ПЦР [7].

Вариабельность экспрессии любых референсных генов не является постоянной и в различных экспериментальных условиях может сильно изменяться, поэтому выбор генов для нормализации данных является необходимым этапом эксперимента, и даже применение широко используемых в современных исследованиях референсных

генов требует предварительной оценки их стабильности [9].

Данных об использовании референсных генов губок крайне мало. В единичных исследованиях морских и пресноводных губок в количественной ПЦР для нормализации данных использовались такие гены как α -тубулин, 28S рРНК, убиквитин [6].

Проблема выбора генов часто усложняется в случае нетиповых моделей биологических экспериментов, так как для многих организмов недостаточно информации о геноме исследуемого объекта. К таким малоисследованным объектам относятся пресноводные эндемичные байкальские губки. Наблюдающаяся в настоящее время массовая гибель байкальских губок, и в первую очередь ветвистой формы *Lubomirskia baicalensis*, требует срочной оценки их состояния, в том числе с помощью анализа экспрессии генов с применением ПЦР в режиме реального времени. Кроме того, исследования различных биологических процессов в байкальских губках представляют большой теоретический и практический интерес в связи с уникальностью этих древних

организмов и возможностью их использования в качестве различных моделей, в частности, для изучения процессов биосилификации [2].

Таким образом, целью данной работы является выбор референсных генов, для нормирования данных количественной ПЦР. Для этого нами проанализированы шесть потенциальных референсных генов: рибосомальный белок 11 (*rpl11*), β-актин (*actb*), эукариотический фактор элонгации трансляции 1α (*eef1A1*), миозин II (*myo*), лектин L6 (*lgalsl*), профилин (*pfn*), и проведена оценка стабильности экспрессии каждого из них с помощью программ NormFinder и BestKeeper.

Материалы и методы исследования

Взрослые ветвистые *L. baicalensis* собирали при помощи водолазов в южной котловине Байкала. Живые образцы губок транспортировали в лабораторию при температуре 3-4 °С. Видовую идентификацию губок проводили по внешним морфологическим признакам. Для выбора референсных генов анализировали 9 образцов губок и 8 образцов примморф. Взрослые губки были собраны в феврале 2013, марте 2012, апреле 2013, июне 2013 и августе 2014 на глубине 10 м. Примморфы получали из взрослых губок и после двух месяцев культивирования индуцировали добавлением силиката натрия ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) до конечной концентрации 70 мМ. Примморфы размером 3 мм в диаметре из неиндуцированной и индуцированных три, пять и семь дней культур отбирали в количестве 10 штук для экстракции РНК. Выделение суммарной РНК проводили с помощью реагента Trisol LS ("Ambion/Life Technologies") по протоколу производителя. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре Nanovue (GE Healthcare) и 1 мкг использовали для обработки свободной от РНКаз ДНКазой 1 ("Thermo Scientific"), которую брали из расчета 1 ед на 1 мкг РНК и инкубировали при 37 °С в течение 15 мин в 1х буфере для ДНКазы 1, содержащем Mg^{2+} , инактивировали фермент при 65 °С 10 мин и половину объема (5 мкл) использовали для постановки реакции обратной транскрипции (ОТ). Качество РНК контролировали с помощью электрофореза при окрашивании РНК бромистым этидием. При наличии двух четких полос рРНК, одинаковой интенсивности окраски и отсутствии низкомолекулярной РНК, пробы РНК использовали для постановки ОТ и ПЦР. Реакцию ОТ проводили в 20 мкл реакционной смеси с помощью набора для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген) и гексаолигонуклеотидными праймерами, согласно инструкции, реакционную смесь инкубировали в течение часа при 37 °С.

Последовательности праймеров для амплификации генов *actb*, *eef1A1*, *rpl11* выбраны на основе выравнивания (из имеющихся в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей морских и пресноводных губок JX050219, HQ677599, HQ693078, JQ606685, FJ529210, DQ087461, AY580191, XM_003384761, GQ330985, GQ330974, HF570277). Выравнивание последовательностей и выбор праймеров проводили в программах BioEdit (версия 7.0.9.0) [3] и OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com>). Полученные в ПЦР ампликоны ожидаемой длины выре-

зали из геля 0,8% агарозы, очищали и клонировали в векторе pAL-TA ("Евроген"), согласно инструкции производителя. Клоны, содержащие вставки, секвенировали на приборе ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer ("Applied Biosystems"). Специфичность полученных нуклеотидных последовательности оценивали в программе BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и с помощью анализа последовательностей искомым геном губок, в том числе в сравнении с последовательностями мРНК близкородственной пресноводной губки *E. muelleri* (номер проекта в Genbank PRJNA230473). Последовательности трех других генов, *myo* (миозин), *lgalsl* (лектин), *pfn* (профилин) выбрали на основе данных частичного секвенирования транскриптома *L. baicalensis*. Полученные нуклеотидные последовательности мРНК исследуемых генов депонированы в базу данных GenBank с номерами доступа KR708639 – KR708644.

На основе полученных последовательностей с помощью программы Primer3Plus [10] были выбраны праймеры для проведения количественной ПЦР. Специфичность праймеров оценена с помощью программы BLAST и выбраны праймеры, специфичные исследуемому объекту и не способные амплифицировать гены симбионтов губок, бактерий и зеленых водорослей. Для проведения количественной ПЦР в реальном режиме времени использовали следующие праймеры:

rpl11_f 5'-ATGAATGCGCAAGGAAAAC-3', *rpl11_r* 5'-CTTGTTACACGGTGTTCG-3' (203 п.н.);
actb_f 5'-ACTGGGACGACATGGAGAAG-3', *actb_r* 5'-TGGCTAGGGTGTGAAGGTC-3' (162 п.н.);
eef1A1_f 5'-GCAGCTAATCGTTGGTGTCA-3', *eef1A1_r* 5'-GTAGGTCGGTCTCTCTCG-3' (182 п.н.);
myo_f 5'-GAGCAGGGTACAATGGAGGA-3', *myo_r* 5'-TCAATGCCAGTCAACAGAGC-3' (155 п.н.);
lgalsl_f 5'-CCCATCCACAGGCAGAGTAT-3', *lgalsl_r* 5'-GGCTACATCTGGGGAGTCAA-3' (168 п.н.);
pfn_f 5'-CCAAGCTTCTGGCATCTACC-3', *pfn_r* 5'-CTTGTTTCGATTCCTGT-3' (175 п.н.).

Реакцию количественной ПЦР проводили в 0,2 мл пробирках на приборе Rotor-Gene Q ("Qiagen") для чего использовали готовую 5х смесь qPCRmix-HS (Евроген, Россия), содержащую интеркалирующий краситель SYBR Green I, 5 пмоль каждого праймера, 1 мкл матрицы кДНК, воду Milli-Q до конечного объема 15 мкл. Для проведения количественной ПЦР и анализа экспрессии гена силикатина альфа (*sila*) использовали праймеры *silAf* 5'-GGAGATTGTGGTGCCAGCTATGC-3' и *silAr* 5'-GCTCTGTGTCTCGATCCACCGT-3' (204 п.н.), выбранные на основе последовательности с номером AJ786771 в базе данных GenBank.

Каждый образец амплифицировали в трех повторностях в режиме 4 мин 95 °С, с последующими 40 циклами: 15 с 95 °С, 15 с – 61 °С, 20 с – 72 °С. По окончании амплификации анализировали кривые плавления в диапазоне температур 61 – 95 °С, флуоресценцию измеряли с шагом 0,5 °С. В качестве отрицательных контролей использовали реакционную смесь без матрицы и с РНК матрицей без этапа обратной транскрипции для контроля контаминации геномной ДНК. Значения порогового цикла (Ct) рассчитывали как среднее значение трех повторностей каждого образца.

Оценку эффективности ПЦР проводили при амплификации каждого гена, анализируя по 6 двукрат-

ных разведений кДНК после построения стандартных кривых с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene Q ("Corbett Research"). Анализ стабильности экспрессии генов проводили с помощью программ NormFinder и BestKeeper, имеющихся в свободном доступе [1, 8]. Расчет количества кДНК кандидатных референсных генов проводили с помощью метода дельта Ct [5].

Результаты исследования и их обсуждение

Для всех исследуемых в качестве референсных генов, *rpl11*, *actb*, *eef1A1*, *myo*, *lgalsl* и *pfn*, получены специфичные нуклеотидные последовательности и разработаны праймеры для количественной ПЦР. Предварительная оценка показала, что эффективность реакций варьировала от 88 до 107%, а коэффициенты корреляции были выше 0,99, что позволяет применять метод

$\Delta\Delta Ct$ для определения уровня экспрессии генов [5]. Кривые плавления для всех реакций показывали один пик, соответствующий температуре плавления специфичного ампликона. Анализ пороговых значений Ct , показал, что в приморфах и взрослых губках *L. baicalensis* представленность транскриптов в образцах уменьшалась в ряду *actb*>*pfn*>*eef1A1*>*rpl11*>*myo*>*lgalsl*. Пороговые значения Ct исследованных генов варьировали в диапазоне от 11 до 22 циклов.

Для поиска наиболее стабильно экспрессирующихся генов проводили количественную ПЦР и оценивали пороговые значения Ct в группах приморф и взрослых губок. Полученные результаты анализировали с помощью программ BestKeeper и NormFinder, использующих различные алгоритмы для выбора наиболее стабильных генов (таблица).

Значения, полученные в программах BestKeeper и NormFinder для потенциальных референсных генов

			actb	rpl11	myo	eef1A1	lgalsl	pfn1
			Приморфы	BestKeeper	SD	0,97	0,99	0,88
CV	6,89	5,11			4,26	6,61	4,73	5,31
r	0,987	0,901			0,870	0,691	0,691	0,989
p	0,001	0,002			0,005	0,001	0,058	0,001
NormFinder	Intragroup variation	0,015		0,017	0,114	0,021	0,067	0,004
	Intergroup variation	0,093		-0,145	0,143	-0,060	0,201	-0,233
Губки	BestKeeper	SD	0,94	0,85	0,70	0,94	1,02	0,83
		CV	7,59	4,89	3,75	5,86	5,23	5,62
		r	0,805	0,925	0,975	0,882	0,794	0,927
		p	0,005	0,001	0,001	0,001	0,006	0,001
	NormFinder	Intragroup variation	0,206	0,229	0,043	0,398	0,527	0,619
		Intergroup variation	-0,093	0,145	-0,143	0,060	-0,201	0,233
Приморфы + губки	NormFinder	Stability value	0,199	0,244	0,239	0,203	0,326	0,324

R – коэффициент корреляции, CV – коэффициент вариации, SD – стандартное отклонение, p – значение вероятности, Intragroup variation – внутригрупповая вариация, Intergroup variation – межгрупповая вариация, Stability value – показатель стабильности (Normfinder). Жирным шрифтом приведены значения показателей генов не прошедших критерии отбора референсных генов.

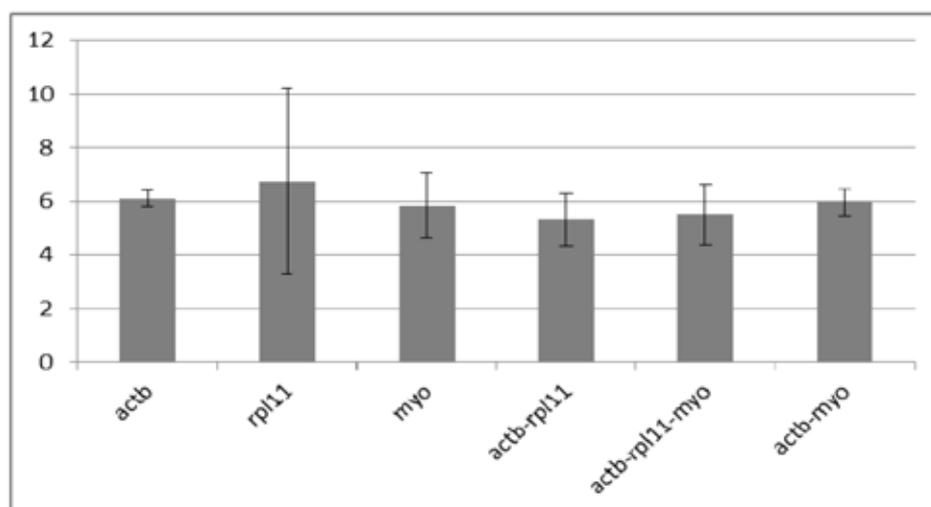
Программа BestKeeper основывается на анализе пороговых значений C_t , показателей стандартного отклонения (SD) и коэффициента корреляции (R) для каждого гена в ряду данных. Гены с наиболее стабильной экспрессией имеют наименьшие показатели SD и максимально близкие к 1 показатели R, кроме того, гены с величиной $SD > 1$, не соответствуют требованиям к референсным генам и исключаются из дальнейшего анализа. С помощью программы BestKeeper отдельно анализировали два набора данных, полученных для примморф и взрослых губок. В результате анализа наиболее стабильными генами с наименьшими показателями SD в обеих группах были гены *myo* и *pfn*, а наименее стабильными генами оказались гены *lgalsl* и *eef1A1*.

С помощью программы NormFinder были проанализированы те же данные количественной ПЦР, полученные для двух групп образцов, примморф и взрослых губок. Алгоритм анализа NormFinder основан на значениях C_t референсных генов, переведенных в линейную шкалу с помощью калибровочной кривой или метода дельта C_t (использованного в данной работе). Выбор наиболее стабильных генов обусловлен минимальными показателями стандартного отклонения внутри и между исследуемыми группами. В результате анализа референсных генов в группах примморф и взрослых губок программой был определен наиболее стабильный ген – *actb* и наилучшая комбинация двух генов – *actb* и *rpl11*. Несмотря на близкий к *actb* показатель стабильности, ген *eef1A1* проявил существенную внутри-

групповую вариабельность (в группе взрослых губок), что не позволяет рекомендовать его в качестве референсного. Ген *myo* показал наиболее близкие значения стабильности и вариабельности с геном *rpl11*. Гены *pfn* и *lgalsl* в программе Normfinder оказались самыми нестабильными в ряду анализируемых генов (показатель стабильности $> 0,3$) и исключены из дальнейшего анализа.

Полученные с помощью двух программ результаты несколько различались, референсные гены, выбранные с помощью программы NormFinder – *actb* и *rpl11*, показали средние значения стабильности при анализе с помощью программы BestKeeper, однако наименее стабильным геном в обоих случаях был ген лектина – *lgalsl*. Отличия в результатах анализа с помощью программ BestKeeper и NormFinder объясняются различными алгоритмами для определения стабильности генов. По сравнению с BestKeeper, NormFinder, учитывающая внутри- и межгрупповую вариацию имеет преимущество при выборе стабильных генов в двух группах, в данном случае, взрослых губок и примморф. На основе обеих программ, согласно рекомендациям по использованию минимум трех генов для корректного нормирования данных количественной ПЦР [4], в качестве референсных нами выбраны гены *actb*, *rpl11* и *myo*.

Для экспериментального подтверждения пригодности выбранных референсных генов была проведена оценка изменения экспрессии гена *sila* во взрослых губках, собранных в различные сезоны года (рисунк).



Относительное изменение уровня экспрессии гена *sila* в губках *L. baicalensis* в весенне-летний период.

Блоки показывают кратность изменения уровня *sila* (Fold Change) в губках, собранных в апреле и июне по сравнению с губкой, собранной в феврале. На горизонтальной оси отмечены референсные гены и их комбинации, использованные для нормирования данных. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

Ген *sila* является маркером склероцитов, клеток, продуцирующих спикулы. Предполагается, что уровень экспрессии гена *sila* увеличивается в весенний период, когда наблюдается активный прирост тела губки. Результаты исследования экспрессии *sila* в *L. baicalensis* получены с помощью метода $\Delta\Delta C_t$. В качестве референсных генов использованы как отдельные гены *actb*, *rpl11*, *myo*, так и их комбинации. Для оценки изменения экспрессии *sila* анализировали два образца губок, собранных в апреле и июне. Для сравнения использовали губку, собранную в феврале месяце, в период минимального роста. Как показано на рисунке, в весенне-летний период произошло увеличение уровня экспрессии *sila* в 5,5 раз при нормировании к комбинации генов *actb*, *rpl11* и *myo*, что подтверждает ожидаемые результаты. При этом значения, полученные при использовании какого-либо одного из выбранных референсных генов, варьируют существенно (0,95 Fold Change), чем при использовании двух и трех генов для нормализации, что подтверждает преимущество применения комбинации трех стабильных референсных генов.

Заключение

В результате работы нами проведен поиск и анализ референсных генов для нормализации данных количественной ПЦР в примморфах и взрослых байкальских губках *L. baicalensis*. Из шести проанализированных кандидатов с помощью программ NormFinder и BestKeeper определены гены с наиболее стабильной экспрессией – *actb*, *rpl11* и *myo*, тогда как гены *eef1a1*, *lgals1* и *pfh* не соответствовали критериям стабильности референсных генов. Выбранные гены и их комбинации были использованы для нормирования данных при анализе экспрессии гена *sila* в губках *L. baicalensis* и показано, что в весенне-летний период

уровень экспрессии увеличился в 5,5 раз. В результате оценки потенциальных референсных генов с помощью программ BestKeeper и NormFinder, а также экспериментального исследования экспрессии гена *sila*, для нормализации данных количественной ПЦР рекомендованы комбинации трех референсных генов: *actb*, *rpl11* и *myo*. Выбранные референсные гены позволяют нормализовать данные количественной ПЦР для исследования экспрессии генов *L. baicalensis* в природной среде и в культуре примморф. Полученные результаты будут способствовать корректному анализу изменений, происходящих на генном уровне, как при исследовании процессов биосилификации, так и при воздействии различных факторов, в том числе в условиях стресса и массовой гибели байкальских губок.

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ № 13-04-00482.

Список литературы

1. Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // Cancer Res. – 2004. Vol. 64. P. 5245-5250.
2. Chernogor L.I. Long-Term Cultivation of Primmorphs from freshwater Baikal Sponges *Lubomirskia baicalensis* / L.I. Chernogor, N.N. Denikina, S.I. Belikov, A.V. Ereskovsky // Mar. Biotechnol. – 2011. Vol. 13. P. 782–792.
3. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. – 1999. Vol. 41. P. 95–98.
4. Jacob F. Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines / F. Jacob, R. Guertler, S. Naim, S. Nixdorf, A. Fedier, N.F. Hacker, V. Heinzelmann-Schwarz // PLoS One – 2013. 8(3):e59180.
5. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. – 2001. Vol. 25(4). P. 402-408.
6. Pantile R., Webster N. Strict thermal threshold identified by quantitative PCR in the sponge *Rhopaloeides odorabile*. Mar. Ecol. Prog. Ser. – 2011. Vol. 431. P. 97-105.
7. Pfaffl M.W. Relative quantification. In: Real-time PCR [Ed. M.T. Dorak]. N. Y.: Taylor and Francis Group, 2006. P. 63–82.
8. Pfaffl M.W. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations / M.V. Pfaffl, A. Tichopad., C. Prgomet., T.P. Neuvians // Biotechnol. Lett. – 2004. Vol. 26(6). P. 509–515.
9. Suzuki T., Higgins P.J., Crawford D.R. Control selection for RNA quantitation // Biotechniques. – 2000. Vol. 29. P. 332–337.
10. Untergasser A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 / A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling et al. // Nucleic. Acids Res. – 2007. Vol. 35. P. 71-74.