

РАЗРАБОТКА ОТ-рвПЦР ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ «ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА» АСТВ И SDHA В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ-ХОЗЯЕВ ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Ляпунова Н.А.,
Хаснатинов М.А.,
Данчинова Г.А.,
Соловаров И.С.

ФГБНУ «Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции
человека» (664003, г. Иркутск,
ул. Тимирязева, 16, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Ляпунова Наталья Андреевна,
e-mail: nataly2193@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Исследования экспрессии генов в клетках животных-хозяев зоонозных инфекций необходимы для понимания механизмов взаимодействия патогена и хозяина и способов существования патогенов в природе. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-рвПЦР) – один из наиболее надёжных и доступных современных методов сравнительного изучения экспрессии генов, поэтому подбор эндогенных стандартов (референтных генов) для нормализации результатов ПЦР является необходимым этапом исследования.

Цель исследования. Разработка ОТ-рвПЦР для выявления транскриптов (матричной РНК (мРНК)) генов субъединицы А сукцинатдегидрогеназы (SDHA) и бета-актина (АСТВ) в культурах клеток млекопитающих – хозяев зоонозных инфекций.

Методы. Культуры клеток почки восточноазиатской лесной мыши *ArpK* и почки эмбриона свиньи СПЭВ выращивали в 24-луночных планшетах. Монослои клеток открепляли трипсином и выделяли суммарную РНК/ДНК. Геномную ДНК удаляли ДНКазой I, свободной от РНКаз. Далее проводили одностадийную ОТ-рвПЦР с использованием разработанных наборов праймеров и соответствующих гидролизующих зондов TaqMan к SDHA и АСТВ. Эксперимент проводили в четырёх независимых воспроизведениях.

Результаты. При детекции мРНК гена АСТВ в обеих культурах клеток и гена SDHA в культуре СПЭВ линейность, эффективность, повторяемость и воспроизводимость теста соответствуют современным требованиям к ОТ-рвПЦР. Детекция мРНК SDHA в клетках *ArpK* отвечает требованиям клинейности и эффективности реакции, однако повторяемость ($CV = 2,7\%$) и воспроизводимость ($CV = 5,8\%$) теста несколько превышают рекомендуемые пределы. Для использования этого гена в качестве референтного требуется исследовать особенности экспрессии SDHA в клетках *ArpK*.

Заключение. Разработана методика ОТ-рвПЦР для оценки экспрессии генов «домашнего хозяйства» АСТВ и SDHA в клетках восточноазиатской лесной мыши (*A. peninsulae*) и свиньи (*S. scrofa*). На следующем этапе исследования необходимо валидировать эти гены в качестве референтных для количественной оценки экспрессии генов млекопитающих-хозяев зоонозных инфекций в норме и при патологии.

Ключевые слова: *Apodemus peninsulae*, *Sus scrofa*, клеточные линии, экспрессия, мРНК, SDHA, АСТВ, гены «домашнего хозяйства», количественная ОТ-ПЦР

Статья поступила: 18.10.2024

Статья принята: 05.11.2024

Статья опубликована: 22.11.2024

Для цитирования: Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Соловаров И.С. Разработка ОТ-рвПЦР для оценки экспрессии генов «домашнего хозяйства» АСТВ и SDHA в культурах клеток млекопитающих-хозяев зоонозных инфекций. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(5): 84-95. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.9

DEVELOPMENT OF RT-qPCR ASSAY FOR ASSESSING THE EXPRESSION OF ACTB AND SDHA HOUSEKEEPING GENES IN THE CELL CULTURES OF MAMMALIAN HOSTS OF ZONOTIC INFECTIONS

Liapunova N.A.,
Khasnatinov M.A.,
Danchinova G.A.,
Solovarov I.S.

Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems
(Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003,
Russian Federation)

Corresponding author:
Natalia A. Liapunova,
e-mail: nataly2193@mail.ru

ABSTRACT

Background. The molecular mechanisms behind the maintenance of zoonotic pathogens in nature can be better understood by examining the gene expression in host cells in response to the infection. Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is a powerful method to study gene expression, especially with the use of endogenous reference genes (RG) to normalize the data. Therefore, it is critical to develop the reliable qRT-PCR assay and validate that selected RGs are stably expressed in the studied organism or cell culture.

The aim. In this work, we aimed to develop the real-time qRT-PCR method for detecting mRNA of two candidate RGs, succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) and beta-actin (ACTB), in the cell lines of mammalian hosts of zoonotic infections.

Materials and methods. The SPEV (porcine embryonic kidney cell line) and ApnK (Korean field mouse kidney cell line) cells were grown in 24-well culture plates. Total RNA/DNA was isolated from trypsin-detached cell monolayers. Genomic DNA in the samples was removed with RNase-free DNase I, and one-step RT-qPCR was performed using primers for SDHA and ACTB gene fragments and the corresponding TaqMan hydrolysis probes. The experiment was performed in 4 independent replicates.

Results. In the Korean field mouse cells, the linearity, efficiency, repeatability, and reproducibility of the RT-qPCR for ACTB gene mRNA corresponded to the modern requirements. However, RT-qPCR for SDHA exhibited good linearity and efficiency of the reaction, but CV values for repeatability and reproducibility slightly exceeded the recommended standards. In porcine cells, both assays had acceptable parameters. Thus, to use the SDHA as RG for ApnK cells, a detailed study of the stability of its expression in this particular model is required.

Conclusions. New qRT-PCR assay was developed to assess the expression of housekeeping genes ACTB and SDHA in the cells of the Korean field mouse and domestic pig. Further research is necessary to validate these genes as references for quantitative assessment of gene expression in the cells of mammalian hosts of zoonotic infections.

Key words: *Apodemus peninsulae*, *Sus scrofa*, cell lines, expression, mRNA, SDHA, ACTB, housekeeping genes, quantitative RT-PCR

Received: 18.10.2024
Accepted: 05.11.2024
Published: 22.11.2024

For citation: Liapunova N.A., Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Solovarov I.S. Development of RT-qPCR assay for assessing the expression of ACTB and SDHA housekeeping genes in the cell cultures of mammalian hosts of zoonotic infections. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(5): 84-95. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.9

ОБОСНОВАНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и по результатам научных исследований, свыше 60 % современных патогенов человека имеют зоонозное происхождение, при этом более 70 % из них перешли к человеку от диких животных [1]. Зоонозные инфекции в естественной среде циркулируют среди диких и домашних животных. Установлено, что существование 65 % патогенов в природе зависит не от одного вида животного-хозяина, а от целого сообщества резервуарных хозяев. Среди млекопитающих наиболее часто с персистенцией патогенов ассоциированы животные – резервуарных, грызунов, парнокопытных и хищных [2]. При этом роль конкретных видов млекопитающих – резервуарных, индикаторных и случайных хозяев патогенных вирусов и бактерий – определяется как врожденной резистентностью, так и специфическим иммунным ответом организма-хозяина [3]. Для изучения механизмов взаимодействия патогенных микроорганизмов и различных животных-хозяев на клеточном уровне необходим инструмент, позволяющий достоверно определять профиль экспрессии различных генов хозяйскими клетками.

Одним из наиболее доступных и эффективных методов анализа профиля экспрессии является определение относительной концентрации матричной РНК (мРНК) целевых генов с помощью обратной транскрипции в сочетании с количественной полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-рвПЦР) [4]. Однако при оценке экспрессии генов в разных образцах методом ОТ-рвПЦР важно принимать во внимание экспериментальные вариации, такие как количество клеток, качество очистки РНК, целостность РНК, эффективность обратной транскрипции, эффективность амплификации ПЦР и др. [5]. Чтобы учесть эти вариации, необходимо нормализовать ОТ-рвПЦР по внутреннему контролю, называемому референтным геном (РГ) или геном домашнего хозяйства ("housekeeping gene") [6]. Гены домашнего хозяйства – это гены, которые всегда экспрессируются в клетках для поддержания функционирования клетки [4]. Сравнение количества мРНК целевого гена с РГ в одном и том же образце обеспечивает надёжную интерпретацию данных экспрессии генов [7]. Однако во многих исследованиях убедительно показано, что уровни экспрессии различных генов домашнего хозяйства могут существенно варьировать в зависимости от гена, типа клетки, тканевой специфичности, вида животного и экспериментальных условий [7, 8]. Уже на ранних этапах развития технологии количественной ПЦР было установлено, что необходимая точность измерения уровня экспрессии достигается только при сравнении со средним геометрическим значением нескольких независимых РГ [8]. В настоящее время считается, что валидные данные могут быть получены при нормализации данных по двум-пяти РГ [5]. Вследствие всех этих особенностей для каждого нового исследования необходимо подбирать и валидировать специфичный для используемых организмов и тканей набор РГ.

Ранее нами была разработана перевиваемая клеточная линия почки одного из важнейших хозяев многих зоонозных инфекций, восточноазиатской лесной мыши *Apodemus peninsulae* (Thomas, 1907) и проведена оценка репродукции вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в клетках резервуарного позвоночного хозяина в сравнении с общепринятой лабораторной моделью инфекции ВКЭ – клетками почки эмбриона свиньи СПЭВ [9]. В рамках развития этой модельной системы необходимо разработать инструмент для количественной оценки экспрессии в норме и в ходе инфекционного процесса в клеточных линиях *A. peninsulae* и *Sus scrofa*, поскольку даже для одного вида млекопитающих могут требоваться разные РГ для разных типов ткани в разных условиях [10]. При этом если для *S. scrofa* опубликованные к настоящему моменту данные по отбору и валидации РГ довольно представительны, то для *A. peninsulae* подобных исследований нами в открытых источниках не обнаружено.

В настоящее время для сравнительных исследований экспрессии генов млекопитающих широко используется более 15 основных РГ [10, 11]. В рамках данного исследования мы сконцентрировали внимание на двух генах, кодирующих бета-актин (*ACTB*) и субъединицу А сукцинатдегидрогеназного комплекса (*SDHA*). Бета-актин – это белок, участвующий в подвижности, структуре и целостности клеток-эукариот [12]. Субъединица А сукцинатдегидрогеназного комплекса входит в белковый комплекс, который встраивается в мембрану митохондрий и участвует в работе цикла Кребса и дыхательной цепи [13]. Известно, что ген *ACTB* является очень вариабельным [11], и, тем не менее, он широко используется в научных исследованиях по изучению экспрессии генов [8, 11], поскольку экспрессируется повсеместно [11]. Помимо прочего, *ACTB* является одним из наиболее валидных РГ для 17 различных тканей свиней, включая ткани почек [14]. Основным аргументом в пользу выбора *SDHA* стало то, что он является одним из наиболее стабильно экспрессируемых генов домашнего хозяйства как у близкородственного вида грызунов – желтогорлой лесной мыши *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) [15], так и у свиней [14, 16]. Установлена стабильность экспрессии генов *ACTB* и *SDHA* в самых разных организмах, тканях и органах, включая опухолевые клетки мозга человека [17], субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов после короткого и длительного периодов активации [18], клетках тонкого и толстого кишечника овец, заражённых желудочно-кишечными нематодами [19], здоровых и раковых клетках человека, мыши и собаки [20]. Следует отметить, что в нашем исследовании использованы низкопассажные перевиваемые клеточные линии, поэтому можно предположить, что выбранные в качестве референтов гены будут экспрессироваться не менее стабильно, чем в раковых клетках. Также показана эффективность *ACTB* и *SDHA* в качестве РГ для профилирования экспрессии при заражении культур клеток и лабораторных животных инфекционными агентами, включая вирус лихорадки Денге [21], вирус японского энцефалита [22], морбилливирусы [23], возбудитель болезни Лайма *Borrelia burgdorferi sensu stricto* [24].

В связи с этим **целью данного исследования** стала разработка методики ОТ-рвПЦР для выявления транскриптов генов *SDHA* и *ACTB* в культурах клеток млекопитающих – хозяев зоонозных инфекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработка праймеров

В работе использовались разработанные специфичные и универсальные праймеры, а для повышения специфичности реакции – соответствующие гибридизационные зонды TaqMan (табл. 1). Публично доступные в базе данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) последовательности мРНК генов *SDHA* (номера доступа GenBank NM_023281, XM_014548703, XM_006762445, XM_036308495 и XM_021076931) и *ACTB* (XM_003124280, AB547904 и XM_005878947) для грызунов рода *Apodemus* sp. и парнокопытных рода кабанов *Sus* sp. выравнивали попарно с использованием алгоритма CLUSTAL W, встроенного в программу BioEdit 7.0.5.3, и ручной доработки.

Также в работе использовали веб-инструмент для проектирования олигонуклеотидов OligoCalc¹. Специфичность праймеров и зондов была протестирована *in silico* с помощью инструмента BLAST².

Культуры клеток млекопитающих

Перевиваемая клеточная линия почки эмбриона свиньи СПЭВ была приобретена в «Коллекции клеточных линий человека и животных для исследований в области вирусологии» (ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург). Перевиваемая адгезивная клеточная линия почки *Apodemus peninsulae* (Thomas, 1907)

АрпК была получена в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (Иркутск) [9]. В работе использовали сток клеток на 60-м пассаже. Поддержание культур клеток осуществляли на среде RPMI1640 с добавлением антибиотиков и 10%-й (АрпК) или 5%-й (СПЭВ) эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) HyClone (Thermo Fisher Scientific, Великобритания).

Подготовка клеток

Для исследования экспрессии генов клетки открепляли с помощью трипсина с добавлением 0,5 mM EDTA (Т/Е), ресуспендировали в ростовой среде, определяли концентрацию с помощью камеры Горяева и сеяли в 24-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток на лунку. Планшеты инкубировали в течение 16–18 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. На следующее утро ростовую среду заменяли средой поддержки (RPMI1640 с добавлением антибиотиков и 2%-й ЭТС). Через 24 ч инкубации среду поддержки удаляли, клетки трижды промывали бессывороточной средой и открепляли 0,25 мл Т/Е. После этого в каждую лунку добавляли 0,25 мл среды поддержки, клетки ресуспендировали и переносили в 1,5 мл пробирки «Эппендорф». Клетки осаждали центрифугированием при +4 °C, ресуспендировали в 1 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS; pH = 7,4), определяли концентрацию клеток и переносили в криопробирки в аликвотах, содержащих по 5×10^4 клеток для каждого образца. Клетки осаждали центрифугированием при +4 °C, супернатант удаляли, осадок клеток хранили при –70 °C и использовали целиком однократно для выделения РНК. Все этапы работы по сбору образцов клеток проводились на льду. Эксперимент проводился в 4 независимых воспроизведениях.

ТАБЛИЦА 1
ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В ОТ-рвПЦР

Локус	Специфичность	Обозначение	Последовательность	Предназначение	Длина ампликона, н. о.
SDHA	<i>Sus scrofa</i> СПЭВ	Sdha-17-F-Sus	GGCCTAACTTCGCTCCAAC	прямой	106
		Sdha-123-R-Sus	AATGAACCACTGCTCGCAG	обратный	
		Sdha-54-Prb-Sus	FAM-ACTGCTCGATACAGGAAGTCCGGCTC-BHQ-1	зонд	
	Muridae АрпК	Sdha-447-F-Mus	ATCCAYTACATGACAGAGCA	прямой	209
		Sdha-656-R-Mus	AGAYCTTCCATACAACGTGTG	обратный	
		Sdha-557-Prb-Mus	FAM-CCTTTCCCAAAGTCTGAGGCTCTGT-BHQ-1	зонд	
ACTB	Mammalia СПЭВ АрпК	Actb-618-F-Sus	GTGCCCATCTACGAGGG	прямой	120
		Actb-738-R-Sus	TGGTGGTGAAGCTGTAGC	обратный	
		Actb-661-Prb-Sus	Cy5-TCAGGTCCCGGCCAGCCAGGTCCAGAC-BHQ-2	зонд	

¹ <https://biotools.nubc.northwestern.edu/OligoCalc.html>

² <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

TABLE 1
PRIMERS USED FOR RT-qPCR

Выделение РНК

Для каждого образца РНК выделяли из 5×10^4 клеток с использованием наборов HiPure Total RNA Kit (Magen Biotechnology, Гуанчжоу) и RNase Free DNaseI Set (Magen Biotechnology, Гуанчжоу) согласно инструкции производителя. Объём очищенного препарата РНК составлял 100 мкл. Контроль качества очистки РНК от геномной ДНК производили с помощью ПЦР без стадии обратной транскрипции с праймерами к целевым генам. Препараты РНК считали пригодными для дальнейших исследований при отсутствии накопления специфичного флуоресцентного сигнала в рвПЦР и при отсутствии специфичных ампликонов в электрофорезе после рутинной ПЦР. В качестве матрицы для проведения одностадийной ОТ-рвПЦР использовали 1 мкл суммарной РНК. В каждой постановке использовали отрицательные контроли выделения РНК.

Обратная транскрипция и ПЦР

Одностадийную ОТ-рвПЦР проводили с помощью набора реагентов Luna Universal Probe One-Step RT qPCR (New England Biolabs, США) согласно инструкции производителя. Реакцию проводили в режиме реального времени в объёме 20 мкл. В реакционную смесь добавляли два специфичных праймера до рабочей концентрации 400 нМ каждого праймера, соответствующий зонд до концентрации 200 нМ и 1 мкл РНК-матрицы. Режим ПЦР включал обратную транскрипцию при 55 °C в течение 10 мин, инактивацию ревертазы при 95 °C в течение 1 мин и 45 циклов ПЦР: 95 °C – 10 с; температура отжига (T_a , °C) – 1 с; 60 °C – 20 с. Температуру отжига праймеров и зондов оптимизировали в диапазоне от 55 °C до 66 °C. Рутинную рвПЦР проводили с использованием набора реагентов Encyclo (Евроген, Москва) согласно инструкции производителя в режиме: 95 °C в течение 1 мин и 45 циклов ПЦР: 95 °C – 10 с; T_a – 1 с; 60 °C – 20 с. Интенсивность флуоресценции измеряли на стадии 60 °C каждого цикла ПЦР по каналам FAM и Cy5. Циклом количественного определения (C_q , quantification cycle) считали первый цикл, при котором интенсивность флуоресцентного сигнала превышала 10 стандартных отклонений от фона. Фоновая составляющая учитывалась с 1-го по 10-й цикл. Расчёты выполняли с помощью программы BioRad CFX Manager v. 3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., США). Для ОТ-рвПЦР и рвПЦР использовали два разных амплификатора CFX96 C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories Inc., США). В каждой постановке использовали отрицательные (PCR–) и положительные (PCR+) контроли ПЦР, в качестве PCR+ использовали препарат суммарных нуклеиновых кислот соответствующей клеточной линии до обработки DNaseI. Все четыре этапа: подготовку образцов клеток, выделение РНК, приготовление реакционных смесей и ПЦР, – проводили в разных помещениях с использованием отдельных наборов оборудования, инструментов и посуды.

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР

Для оценки специфичности ПЦР и наличия неспецифичных продуктов реакции амплифицированные ПЦР-

продукты разделяли методом электрофореза в 2%-м агарозном геле с использованием следующих параметров: 100 V, 80 W, 400 mA. В лунки геля вносили по 10 мкл исследуемых продуктов ПЦР. Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны 312 нм. Для определения размеров ампликонов параллельно загружали маркер молекулярного веса ДНК с набором фрагментов от 100 до 1500 н. о. (БиоСан, Новосибирск).

Оценка вариабельности ОТ-рвПЦР

Вариабельность теста ОТ-рвПЦР оценивали на основе 10 повторов одного и того же образца РНК. Для полученных значений C_q анализировали максимальное, минимальное и медианное значения, 25%-й и 75%-й квартили и интерквартильный размах (IQR, interquartile range). Данные выражали в виде боксплот-графика с указанием всех сравниваемых параметров. Далее исследовали вариабельность определения C_q каждого из генов в пределах одной клеточной линии (например, вариабельность C_q *ACTB* в сравнении с C_q *SDHA* в СПЭВ) и вариабельность анализа одного и того же гена в разных культурах клеток (например, вариабельность C_q *ACTB* в СПЭВ в сравнении с C_q *ACTB* в АрпК). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Оценка линейности и эффективности ОТ-рвПЦР

Для каждого из четырёх независимых повторов РНК приготавливали серию из трёх независимых десятикратных разведений в свободной от РНКаз воде от 10^{-1} до 10^{-3} . Для каждого образца РНК рассчитывали средние значения C_q , полученные в ОТ-рвПЦР в ходе одного теста и стандартные отклонения средних значений. По средним значениям строили калибровочную кривую, на основании углового коэффициента (slope) которой рассчитывали эффективность реакции (E) в процентах.

Оценка повторяемости и воспроизводимости ОТ-рвПЦР

Повторяемость теста определяли как коэффициент вариации (CV, coefficient of variation; %) четырёх независимых воспроизведений ОТ-рвПЦР в ходе одного теста всех сравниваемых образцов, выполненного в один день и на одном и том же приборе. Воспроизводимость анализа определяли как CV% средних значений независимых воспроизведений ОТ-рвПЦР в ходе четырёх тестов всех сравниваемых образцов, выполненных в разные дни и на разных приборах.

Статистическая обработка

Линейный регрессионный анализ с коэффициентом детерминации R^2 использовали в исследовании для определения линейности стандартной кривой. Зависимость C_q от концентрации РНК считали линейной при $R^2 > 0,8$. Наклон графика использовался для определения эффективности реакции ПЦР (E), которую выражали в процентах и рассчитывали по формуле: $(10[-1/k] - 1) \times 100$, где k – угловой коэффициент (slope)

стандартной кривой. Для оценки вариабельности наблюдений рассчитывали стандартное отклонение средних значений. Статистическую значимость различий медианных значений между группами оценивали с помощью двустороннего U-критерия Манна – Уитни при 95%-м уровне статистической значимости. Выпадающие значения циклов количественного определения РНК исключали с помощью квартильного метода [25]. Для выявления корреляции между концентрацией РНК и показателями сходимости ПЦР-анализа использовали двусторонний метод ранговой корреляции Спирмена. Расчёты производили с помощью программ MS Excel 2003 (Microsoft Corp., США) и MaxStat Lite v. 3.06 (MaxStat, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отработка условий ОТ-ПЦР

Для обоих генов в обеих клеточных линиях амплифицировались фрагменты ожидаемой длины (табл. 1; рис. 1). Однако в ряде случаев при высоких температурах (62–66 °С) количество ПЦР продукта снижалось или амплификации не происходило. Кроме того, в ПЦР с праймерами к гену *SDHA* в клеточной линии АрпК наблюдалась наработка продуктов ПЦР неспецифической длины при большинстве температур, за исключением $T_a = 55$ °С и $T_a = 57,2$ °С. Для сохранения возможности

мультиплексирования реакций и дальнейшего совершенствования теста в качестве рабочей была выбрана $T_a = 55$ °С как минимальная температура, при которой во всех комбинациях праймеров и матрицы нарабатывались только специфичные ампликоны в высоких концентрациях.

Результаты ОТ-ПЦР в режиме реального времени показывают, что кривые амплификации имеют чётко выраженную сигмовидную форму, фоновая флуоресценция незначительна (рис. 2). В положительных контрольных образцах цикл количественного определения *Sq* был ожидаемо выше тестовых образцов по обоим генам, в отрицательных контрольных образцах *Sq* не определялся, что свидетельствует о приемлемом качестве РНК и о пригодности разработанных наборов праймеров и зондов для детекции мРНК генов *ACTB* и *SDHA* исследуемых животных.

Вариабельность определения мРНК референтных генов в ОТ-рвПЦР

При сравнительном анализе исходных препаратов РНК в обеих культурах клеток медианные значения *Sq* для гена *ACTB* были существенно меньше, чем для *SDHA* (рис. 3). Так, в СПЭВ медиана *Sq* *ACTB* составила 19,5 цикла, а *Sq* *SDHA* – 27,4 цикла ($D = 7,9$ *Sq*; $U = 100$; $p = 0,0002$). В клеточной линии АрпК наблюдаемые различия оказались аналогичными: медиана *Sq* составила 17,0 для *ACTB* и 27,0 – для *SDHA* ($D = 10$ *Sq*; $U = 99$; $p = 0,0002$).

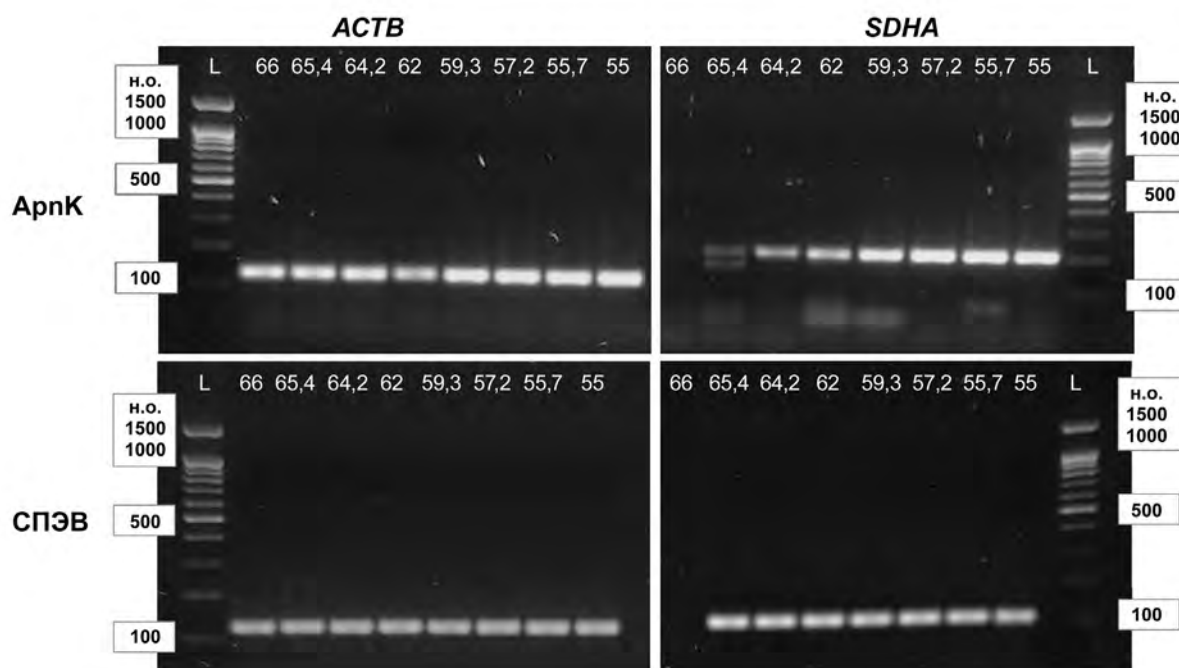


РИС. 1.

Отработка амплификации фрагментов мРНК-транскриптов *ACTB* и *SDHA* (столбцы) в клеточных линиях АрпК и СПЭВ (строки): L – маркер молекулярного веса ДНК; фрагменты длиной 100, 500, 1000 и 1500 н. о. обозначены по краям электрофореграмм; вверху дорожек обозначена соответствующая температура отжига (°С)

FIG. 1.

Amplification of the *ACTB* and *SDHA* mRNA transcript fragments (columns) in ArpK and SPEV cell lines (rows): L – DNA molecular weight marker; the fragments of 100, 500, 1000 and 1500 base pairs are labeled at the edges of the electropherograms; the corresponding annealing temperatures (°C) are indicated at the top of the lanes

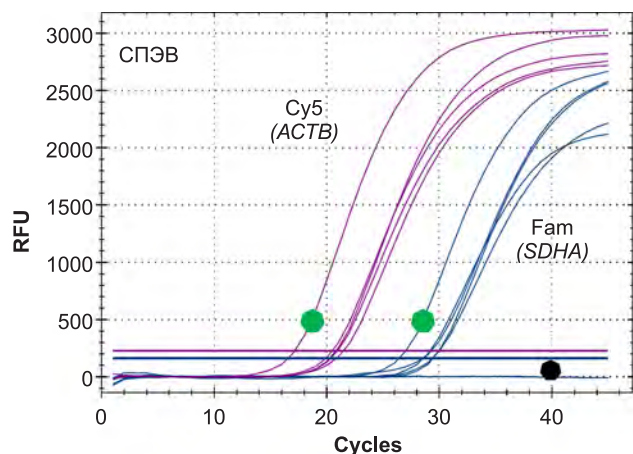


РИС. 2.

ОТ-рвПЦР на матрице РНК клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и восточноазиатской лесной мыши (АрпК): фиолетовые треки – канал флуоресценции Cy5 (детекция ACTB), голубые треки – канал FAM (детекция SDHA); прямые горизонтальные линии – отсекающие значения цикла количественного определения (quantification threshold); зелёные точки – положительные контрольные образцы ПЦР (ДНК-матрица); чёрные точки – отрицательные контрольные образцы (РНК-матрица без обратной транскрипции)

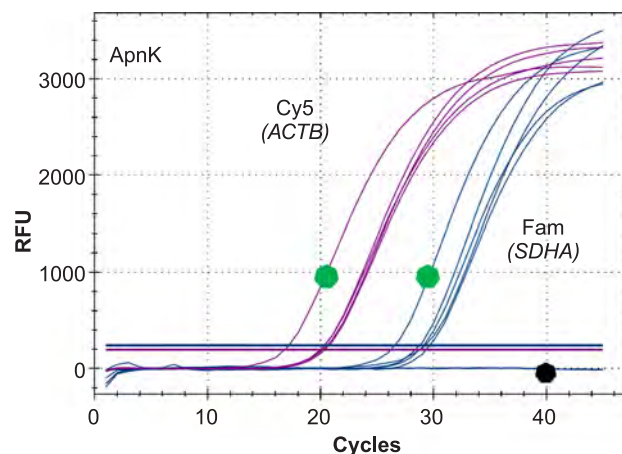


FIG. 2.

The real-time RT-qPCR on the mRNA of pig embryo kidney (SPEV) and Korean field mouse kidney (ApnK) cell lines: violet traces – Cy5 fluorescent signal (ACTB detection); blue traces – FAM signal (SDHA detection); straight horizontal lines – cutoff values of the quantification cycle (quantification threshold); green dots designate the traces corresponding to the positive control samples (DNA template); black dots designate the traces corresponding to the negative control samples (RNA without reverse transcription stage)

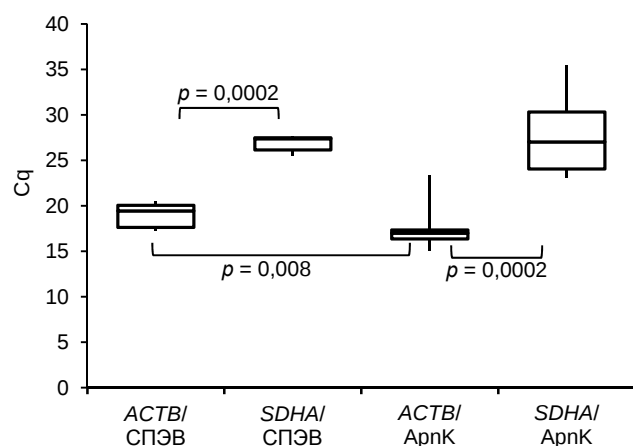


РИС. 3.

Вариабельность 10 повторов ОТ-рвПЦР детекции (C_q , ось ординат) мРНК генов бета-актина (ACTB) и субъединицы А сукцинатдегидрогеназного комплекса (SDHA). Тестовые группы обозначены на оси абсцисс: ACTB/СПЭВ – детекция мРНК ACTB в клеточной линии СПЭВ ($n = 10$); SDHA/СПЭВ – детекция мРНК SDHA в СПЭВ ($n = 10$); ACTB/АрпК – детекция мРНК ACTB в клеточной линии АрпК ($n = 10$); SDHA/АрпК – детекция мРНК SDHA в АрпК ($n = 10$). Медианные значения выборок обозначены горизонтальными линиями, боксы соответствуют 25%–75%-м процентилям, усы отражают разброс крайних значений; статистически значимые различия медианных значений отмечены горизонтальными скобками с указанием значений p (двусторонний U-тест Манна – Уитни)

FIG. 3.

Variability of 10 repeats of real-time RT-qPCR detection (C_q , Y-axis) of beta-actin (ACTB) and succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA) mRNA. Test groups are indicated on the X-axis: ACTB/SPEV – detection of ACTB mRNA in the SPEV cell line ($n = 10$); SDHA/SPEV – detection of SDHA mRNA in the SPEV cell line ($n = 10$); ACTB/ApnK – detection of ACTB mRNA in the ApnK cell line ($n = 10$); SDHA/ApnK – detection of SDHA mRNA in the ApnK cell line ($n = 10$). Median values of samples are indicated by horizontal lines, boxes correspond to 25%–75% percentiles, whiskers reflect the extreme values scatter; statistically significant differences in median values are indicated by horizontal brackets with p values (two-tailed Mann – Whitney U-test)

SPEV – detection of SDHA mRNA in SPEV cell line ($n = 10$); ACTB/ApnK – detection of ACTB mRNA in the ApnK cell line ($n = 10$); SDHA/ApnK – detection of SDHA mRNA in ApnK cell line ($n = 10$). Median values of samples are indicated by horizontal lines, boxes correspond to 25%–75% percentiles, whiskers reflect the extreme values scatter; statistically significant differences in median values are indicated by horizontal brackets with p values (two-tailed Mann – Whitney U-test)

В целом в клетках СПЭВ результаты ПЦР были более однородны, чем в АрпК. Так, в СПЭВ разброс крайних значений по ACTB составил 3,27 цикла, при этом IQR составил 2,44 цикла. По SDHA эти показатели составили 2,12 и 1,34 C_q соответственно. В АрпК аналогичные показатели составили соответственно 8,22 и 1,00 цикла по ACTB и 12,39 и 6,27 цикла по SDHA. Относительно широкий диапазон крайних значений (до 12 циклов) при более узком IQR позволяет предположить, что крайние значения C_q обусловлены наличием выбросов и, скорее всего, являются следствием случайных и технических факторов. Для исключения случайных ошибок в последующих экспериментах в каждом повторе для каждого серийного разведения выявляли выпадающие значения C_q , и те повторы, в которых было обнаружено хотя бы одно выпадающее значение, полностью исключали из анализа.

Линейность и эффективность ПЦР

Для всех калибровочных кривых значение коэффициента детерминации R^2 (линейность) превышало 0,99 (рис. 4). Это позволяет предположить, что во всех исследованных вариантах ОТ-рвПЦР зависимость C_q от кон-

центрации целевой РНК соответствует линейной модели и стремится к функциональной. Средние значения эффективности рвПЦР для клеток *ApnK* составили 93 % (*ACTB*) и 90 % (*SDHA*) с угловыми коэффициентами калибровочных кривых $-3,5$ и $-3,59$ соответственно. Для клеток СПЭВ полученные значения эффективности ПЦР составили 93 % (*ACTB*) и 97 % (*SDHA*), чему соответствовали угловые коэффициенты $-3,49$ и $-3,41$ соответственно.

Повторяемость и воспроизводимость ПЦР-тестов

Коэффициенты вариации при оценке внутриклеточной и межклеточной сходимости определения *SDHA* и *ACTB* указаны в таблице 2. Суммируя результаты, можно отметить, что детекция мРНК *SDHA* была более стабильна в клеточной линии СПЭВ (повторяемость 0,8 %, воспроизводимость 2 %) нежели в линии *ApnK* (2,7 % и 5,8 % соответственно). Однако для мРНК *ACTB* картина была обратной: в СПЭВ оба показателя были выше,

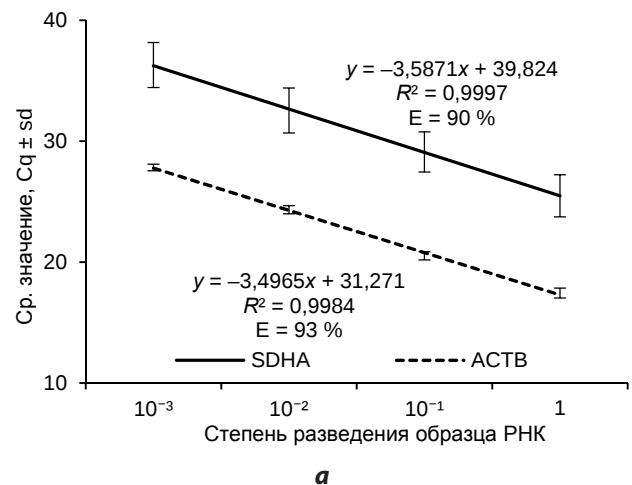


РИС. 4.
Оценка линейности и эффективности ОТ-рвПЦР с праймерами к генам субъединицы А сукцинатдегидрогеназного комплекса (*SDHA*) и бета-актина (*ACTB*) в клеточных линиях *ApnK* (а) и СПЭВ (б)

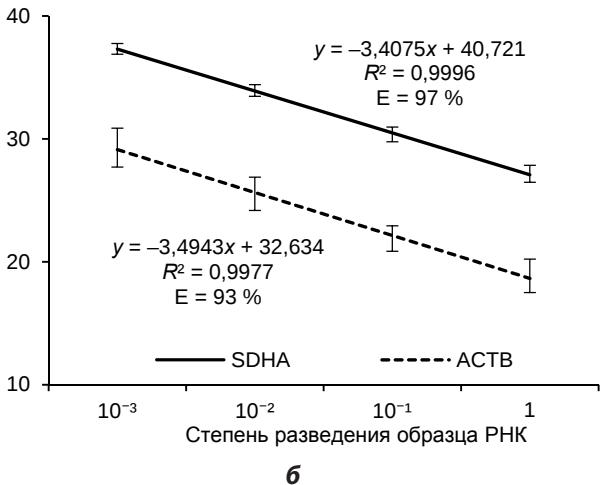


FIG. 4.
Assessment of the linearity and efficiency of real-time RT-qPCR targeting the succinate dehydrogenase subunit A (*SDHA*) and beta-actin (*ACTB*) gene transcripts in the *ApnK* (a) and SPEV (b) cell lines

ТАБЛИЦА 2
ПОВТОРЯЕМОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ
ОТ-рвПЦР ПРИ ДЕТЕКЦИИ мРНК ГЕНОВ *SDHA* И *ACTB*
В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ СПЭВ И *ApnK*

TABLE 2
REPEATABILITY AND REPRODUCIBILITY OF REAL-TIME
RT-qPCR ASSAY FOR mRNA OF *SDHA* AND *ACTB* GENES
IN SPEV AND *ApnK* CELL LINES

Гены	Разведение РНК	Клеточная линия СПЭВ						Клеточная линия <i>ApnK</i>					
		в. т. Cq	SD	CV, %	м. т. Cq	SD	CV, %	в. т. Cq	SD	CV, %	м. т. Cq	SD	CV, %
<i>SDHA</i>	1	27,4	0	0,2	27,1	0,8	3	23,8	0,5	1,9	25,5	1,8	7,1
	10 ⁻¹	30,5	0,4	1,3	30,3	0,7	2,2	27,1	0,8	2,9	29,3	1,6	5,5
	10 ⁻²	34,1	0,3	0,9	33,9	0,5	1,5	30,5	0,8	2,7	32,6	1,8	5,7
	10 ⁻³	37,7	0,2	0,6	37,2	0,4	1,2	34,6	1,2	3,3	36,4	1,9	5,1
	Средняя повторяемость детекции <i>SDHA</i> в СПЭВ – 0,8 %; в <i>ApnK</i> – 2,7 % Средняя воспроизводимость детекции <i>SDHA</i> в СПЭВ – 2 %, в <i>ApnK</i> – 5,8 %												
<i>ACTB</i>	1	17,4	0,1	0,5	18,9	1,3	6,9	17,5	0,1	0,7	17,5	0,4	2,5
	10 ⁻¹	20,9	0,3	1,6	21,8	1	4,4	20,7	0,2	0,9	20,6	0,3	1,5
	10 ⁻²	24,1	0,2	0,9	25,4	1,3	5,1	24,3	0,3	1,2	24,3	0,3	1,1
	10 ⁻³	27,7	0,4	1,5	29,1	1,6	5,4	27,5	0,1	0,4	27,8	0,2	0,9
	Средняя повторяемость детекции <i>ACTB</i> в СПЭВ – 1,1 %, в <i>ApnK</i> – 0,8 % Средняя воспроизводимость детекции <i>ACTB</i> в СПЭВ – 5,5 %, в <i>ApnK</i> – 1,5 %												

Примечание. в. т. Cq – средние циклы количественного определения четырёх внутритестовых повторов; м. т. Cq – средние циклы количественного определения четырёх межтестовых воспроизведений.

чем в АрпК (1,1 % и 5,5 % против 0,8 % и 1,5 % соответственно). В большинстве случаев не было выявлено корреляций между концентрацией РНК и показателями схожести, однако при определении мРНК *ACTB* в клетках АрпК обнаружена сильная статистически значимая положительная взаимосвязь концентрации РНК с воспроизводимостью ($r = 1; p < 0,0001$). Также при детекции *SDHA* в клетках АрпК отмечались выраженная статистически не значимая отрицательная взаимосвязь концентрации РНК с показателями повторяемости ($r = -0,8; p = 0,2$) и положительная – с показателями воспроизводимости ($r = 0,8; p = 0,2$) (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка внутренних количественных стандартов на основе генов домашнего хозяйства с помощью одностадийной ОТ-рвПЦР – это необходимая мера контроля качества и надёжности при исследовании экспрессии целевых генов. При нормализации результатов количественного определения целевых генов по РГ крайне важно убедиться, что каждый РГ стабильно экспрессируется как в норме, так и в экспериментальных условиях, поскольку множество факторов способствуют экспериментальной изменчивости и влияют на количество повторов, необходимых для достижения заданной статистической мощности [5]. Очевидно, что высокое качество и техническая воспроизводимость используемого ПЦР-теста являются необходимым условием для оценки стабильности экспрессии РГ.

В этой работе мы проанализировали пригодность разработанных ОТ-рвПЦР тестов для детекции мРНК генов *ACTB* и *SDHA* в клеточных линиях двух животных, относящихся к разным отрядам – грызуны (Rodentia) и парнокопытные (Artiodactyla). При этом экспрессия генов домашнего хозяйства в клетках важнейшего резервуарного хозяина зоонозных инфекций – восточноазиатской лесной мыши *A. peninsulae* – исследована впервые.

Для гена *ACTB* нам удалось подобрать универсальные праймеры и TaqMan-зонд, которые при моделировании *in silico* выявляли мРНК как свиньи, так и восточноазиатской лесной мыши. Ген *SDHA* оказался более вариabельным, и для каждого из животных пришлось подбирать родоспецифичные праймеры и зонд. В эксперименте все три комплекта праймеров синтезировали ампликоны ожидаемой длины для обеих культур клеток, а в формате ОТ-рвПЦР в обеих культурах клеток кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому гену имели сопоставимую форму и показатели количественного определения (Cq). При оптимизации ОТ-рвПЦР оказалось, что все три теста могут проводиться в одинаковых условиях. В сочетании с дифференциально мечеными зондами (детекция *SDHA* идёт по каналу FAM, а детекция *ACTB* – по Cy5) это открывает возможность для мультиплексирования реакции определения мРНК РГ.

Вариабельность результатов ПЦР-теста является важной технической характеристикой, поскольку различия между повторами в 3 цикла соответствуют де-

сятикратной разнице в концентрации матрицы. С этой точки зрения, в клетках СПЭВ оба ПЦР теста показывают удовлетворительные результаты – IQR после 10 повторов составил 1,5–2,5 цикла. Это означает, что большинство результатов отличаются от медианного значения не более чем на 1–1,5 цикла в большую или меньшую сторону. В клетках АрпК результаты не столь однозначны. По мРНК гена *ACTB* получены удовлетворительные результаты с IQR всего в 1 цикл. Однако по мРНК *SDHA* отклонение составило примерно 3 цикла в большую или меньшую сторону от медианного значения (IQR = 6,27), что соответствует десятикратной погрешности при измерении концентрации мРНК. Также для всех тестов, кроме детекции *SDHA* в клетках СПЭВ, отмечаются завышенные показатели крайних значений (разброс до 12 циклов). Это может указывать на наличие технических погрешностей при проведении тестов и на появление связанных с этим единичных аномальных результатов ПЦР. Для устранения влияния случайных выбросов на дальнейшую работу нами была, с одной стороны, проведена стандартизация процедуры подготовки ПЦР, а с другой – применено исключение из анализа как невалидных тех повторов, в которых с помощью статистических методов были выявлены выпадающие значения.

Эффективность амплификации ПЦР была установлена с помощью построения калибровочных кривых, что обеспечивает простое, быстрое и воспроизводимое показание средней эффективности ПЦР, аналитической чувствительности и надёжности анализа [5]. В ходе работы показано, что оба РГ как в клетках АрпК, так и в СПЭВ попадали в диапазон оптимальных значений эффективности ПЦР (E), определяемый как $90 \% < E < 110 \%$ [7, 26, 27], и допустимых значений углового коэффициента – в пределах от $-3,1$ до $-3,6$ [27]. В то же время значение $E = 90 \%$, полученное для *SDHA* в клетках АрпК, близко к нижней границе оптимального диапазона чувствительности ОТ-рвПЦР. Таким образом, по этим параметрам разработанные нами ПЦР-тесты пригодны для детекции генов бета-актина и субъединицы А сукцинатдегидрогеназного комплекса в мышинных и свиных клетках, но для повышения надёжности анализа не исключается возможность дальнейшей оптимизации условий ПЦР и проведения повторных измерений свежеприготовленных десятикратных разведений образца РНК. Идеальным результатом является $R^2 = 1$, $E = 100 \%$ и $k = -3,32$ [26, 27].

На современном уровне исследований считается, что при оценке повторяемости и воспроизводимости результатов количественной ПЦР «удовлетворительный» диапазон значений CV может варьировать от 20 % до 25 %, однако если расчеты основаны на необработанных значениях циклов количественного определения, рекомендуется использовать более жёсткие критерии: приемлемыми будут значения $\leq 2 \%$ для оценки внутритестовой и $\leq 5 \%$ для оценки межтестовой схожести результатов [27]. В нашем случае все разработанные тесты соответствуют «мягким» критериям пригодности, однако превышение внутритестовой повторяемости до 2,7 % и межтестовой воспроизводимости до 5,8 % по гену *SDHA* в клетках АрпК, а также межтестовой вос-

производимости до 5,5 % по гену *ACTB* в клетках СПЭВ указывает на менее надёжную количественную оценку этих транскриптов. В свою очередь, результаты, полученные по гену *ACTB* в клетках АрнК и по *SDHA* в клетках СПЭВ соответствуют «жёстким» критериям, что говорит о надёжности данных и пригодности выбранных условий реакции для детекции в клеточных линиях млекопитающих с использованием ОТ-рвПЦР.

Суммируя все полученные данные (табл. 3) можно отметить, что ОТ-рвПЦР тест для детекции гена *ACTB* в обеих клеточных линиях по большинству параметров соответствует критериям, предъявляемым к РГ, для изучения экспрессии в клетках млекопитающих. Доработки требуют только повышенный разброс крайних значений и несколько завышенная (на 0,5 %) вариабельность при межтестовом сравнении в клетках СПЭВ. ОТ-рвПЦР тест для детекции *SDHA* полностью соответствовал «жёсткому» варианту требований при анализе клеточной линии СПЭВ, однако в клеточной линии АрнК только показатели линейности и эффективности реакции находились в допустимом диапазоне значений. С одной стороны, наблюдаемые отклонения могут объясняться как техническими причинами, такими как неудачная конструкция праймеров и зонда, неоптимальные условия амплификации, наличие ингибиторов в матрице, технические ошибки при приготовлении серийных разведений и т. п. [28]. С другой стороны, причиной высокой вариабельности детекции мРНК *SDHA* в АрнК могут быть фундаментальные биоло-

гические особенности экспрессии этого гена в данной клеточной линии и/или в почечной ткани *A. peninsulae*. Так, ранее было показано, что в тканях спинного мозга свиньи *SDHA* является одним из самых стабильно экспрессируемых генов домашнего хозяйства, тогда как в спинальных ганглиях – напротив, одним из самых лабильных генов [29]. Более того, при изучении стабильности экспрессии восьми кандидатных РГ в печени желтогорлых мышей *A. flavicollis* наряду с высокой стабильностью *SDHA* было установлено, что ген *ACTB* экспрессируется наименее стабильно из всех [15]. Результаты, полученные в нашем исследовании близкородственного вида *A. peninsulae*, можно интерпретировать как противоположные – детекция транскриптов *SDHA* характеризовалась в целом меньшей стабильностью, чем детекция мРНК *ACTB*. Эти данные позволяют предположить, что экспрессия *SDHA*, по всей видимости, имеет как широкий диапазон в пределах одного организма, так и существенную видовую специфичность. Вероятно, экспрессия генов домашнего хозяйства, в частности *SDHA*, в клетках почек *A. peninsulae* также имеет свои характерные биологические особенности и заслуживает углублённого изучения.

Таким образом, разработанный ПЦР-тест достаточно надёжен для значимой биологической интерпретации с использованием *ACTB* в качестве РГ, однако для *SDHA* необходима дополнительная оптимизация анализа. Прежде всего, необходимо снизить техническую погрешность. Наиболее перспективным спо-

ТАБЛИЦА 3
СВОДНЫЕ ДАННЫЕ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ,
СООТНОСЯЩИМСЯ С ИЗМЕНЧИВОСТЬЮ РЕАКЦИИ
ОТ-рвПЦР ПРИ ДЕТЕКЦИИ мРНК ГЕНОВ *SDHA* И *ACTB*
В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ СПЭВ И АрнК

TABLE 3
SUMMARY DATA ON PARAMETERS RELATED TO REAL-
TIME RT-qPCR REACTION VARIABILITY IN DETECTION
OF mRNA OF *SDHA* AND *ACTB* GENES IN SPEV AND АрнК
CELL LINES

Показатели	Гены	Клеточная линия	
		АрнК	СПЭВ
Разброс значений, Cq	<i>SDHA</i>	12,39*	2,12
Интерквартильный размах, Cq		6,27*	1,34
Угловой коэффициент (slope), k		-3,6	-3,4
Эффективность ПЦР, %		90	97
Средняя повторяемость детекции, CV%		2,7*	0,8
Средняя воспроизводимость детекции, CV%		5,8*	2
Разброс значений, Cq	<i>ACTB</i>	8,22*	3,27*
Интерквартильный размах, Cq		1,00	2,44
Угловой коэффициент (slope), k		-3,5	-3,5
Эффективность ПЦР, %		93	93
Средняя повторяемость детекции, CV%		0,8	1,1
Средняя воспроизводимость детекции, CV%		1,5	5,5*

Примечание. * – требуется оптимизация анализа.

сособом нам представляется автоматизация процедур выделения РНК, приготовления серийных разведений матрицы для построения калибровочной кривой и приготовления реакционных смесей. Это позволит как уменьшить вероятность технической ошибки операторов, так и снизить вероятность внесения ингибиторов, спорадической кросс-контаминации образцов. Также необходимо разработать альтернативный комплект *SDHA*-специфичных праймеров с включением интрона для снижения вероятности неспецифичной гибридизации зонда. В случае, если эти меры не приведут к снижению вариабельности анализа, потребуется замена и/или введение третьего РГ.

Проанализированная в ходе работы информация указывает на принципиальную возможность оптимизации и использования подобранных экспериментальных условий ОТ-рвПЦР и обосновывает направление дальнейших исследований. Прежде всего, необходима оценка стабильности экспрессии РГ *SDHA* и *ACTB* при воздействии различных факторов на клетки в условиях *in vitro*, что позволит валидировать методику количественного определения целевых генов. Также дизайн использованных праймеров и зондов гипотетически допускает мультиплексирование реакции, что значительно расширит аналитические возможности, а также сократит время проведения и снизит себестоимость ПЦР-анализа [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования разработана методика оценки экспрессии генов «домашнего хозяйства» *ACTB* и *SDHA* в клетках восточноазиатской лесной мыши (*A. peninsulae*) и свиньи (*S. scrofa*) на основе ОТ-рвПЦР. Разработанные ПЦР-тесты позволяют обнаруживать мРНК широкого спектра животных, имеют высокие показатели вариабельности, линейности, эффективности, повторяемости и воспроизводимости анализа и обладает потенциалом к мультиплексированию количественной оценки экспрессии. Это обуславливает необходимость и целесообразность дальнейшей оптимизации и валидации разработанной методики в качестве базового инструмента для количественной оценки экспрессии генов млекопитающих-хозяев зоонозных инфекций в норме и при патологии.

Финансирование

Работа выполнена в рамках НИР ПНИ № 123051600027-

1.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (Иркутск).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. FAO, UNEP, WHO, and WOA. One Health Joint Plan of Action (2022–2026). *Working together for the health of humans, animals, plants and the environment*. Rome; 2022. doi: 10.4060/cc2289en
2. Plourde BT, Burgess TL, Eskew EA, Roth TM, Stephenson N, Foley JE. Are disease reservoirs special? Taxonomic and life history characteristics. *PLoS One*. 2017; 12(7): e0180716. doi: 10.1371/journal.pone.0180716
3. Donoso MO, Karan LS, Růžek D. Tick-borne encephalitis viruses: A general overview. In: *Flavivirus encephalitis*. 2011: 133-156. doi: 10.5772/21912
4. Halouani A, Jmii H, Michaux H, Renard C, Martens H, Pirotin D, et al. Housekeeping gene expression in the fetal and neonatal murine thymus following coxsackievirus B4 infection. *Genes (Basel)*. 2020; 11(3): 279. doi: 10.3390/genes11030279
5. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
6. De Spiegelaere W, Dern-Wieloch J, Weigel R, Schumacher V, Schorle H, Nettersheim D, et al. Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0122515. doi: 10.1371/journal.pone.0122515
7. Panina Y, Germond A, Masui S, Watanabe TM. Validation of common housekeeping genes as reference for qPCR gene expression analysis during iPSC reprogramming process. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 8716. doi: 10.1038/s41598-018-26707-8
8. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3(7): RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
9. Хаснатинов М.А., Болотова Н.А., Миловидов К.С., Дачинова Г.А., Кондратов И.Г. Репликация РНК вируса клещевого энцефалита в новой перевиваемой линии клеток естественного хозяина *Apodemus peninsulae*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 36(1): 41-45. [Khasnatinov MA, Bolotova NA, Milovidov KS, Danchinova GA, Kondratov IG. Replication of RNA of tick-borne encephalitis virus in new transferable cell lines of the natural host *Apodemus peninsulae*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2018; 36(1): 41-45. (In Russ.)]. doi: 10.18821/0208-0613-2018-36-1-41-45
10. Chapman JR, Waldenström J. With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0141853. doi: 10.1371/journal.pone.0141853
11. Adeola F. Normalization of gene expression by quantitative RT-PCR in human cell line: comparison of 12 endogenous reference genes. *Ethiop J Health Sci*. 2018; 28(6): 741-748. doi: 10.4314/ejhs.v28i6.9
12. Gu Y, Tang S, Wang Z, Cai L, Lian H, Shen Y, et al. A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of β -actin (*ACTB*) in human cancers. *Bioengineered*. 2021; 12(1): 6166-6185. doi: 10.1080/21655979.2021.1973220
13. Higuera A, Muñoz M, López MC, Reyes P, Urbano P, Villalobos O, et al. Succinate dehydrogenase gene as a marker for studying *Blastocystis* genetic diversity. *Heliyon*. 2020; 6(11): e05387. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05387

14. Nygard AB, Jørgensen CB, Cirera S, Fredholm M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol.* 2007; 8: 67. doi: 10.1186/1471-2199-8-67
15. Axtner J, Sommer S. Validation of internal reference genes for quantitative real-time PCR in a non-model organism, the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*. *BMC Res Notes.* 2009; 2: 264. doi: 10.1186/1756-0500-2-264
16. McCulloch RS, Ashwell MS, O'Nan AT, Mente PL. Identification of stable normalization genes for quantitative real-time PCR in porcine articular cartilage. *J Anim Sci Biotechnol.* 2012; 3(1): 36. doi: 10.1186/2049-1891-3-36
17. Röhn G, Koch A, Krischek B, Stavrinou P, Goldbrunner R, Timmer M. *ACTB* and *SDHA* are suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human astrocytomas using quantitative RT-PCR. *Technol Cancer Res Treat.* 2018; 17: 1533033818802318. doi: 10.1177/1533033818802318
18. Geigges M, Gubser PM, Unterstab G, Lecoulter Y, Paro R, Hess C. Reference genes for expression studies in human CD8⁺ naïve and effector memory T cells under resting and activating conditions. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 9411. doi: 10.1038/s41598-020-66367-1
19. Lucas Nascimento Souza J, Cavalcante Silva F, da Silva CG, Maria Fortaleza Neves Bomfim I, Rocha de Medeiros H, Giotto Zaro L. Analysis of the stability of the reference genes *GAPDH*, *SDHA* and *RPL-19* in sheep from a semi-arid region infected by gastrointestinal nematodes. *BMC Vet Res.* 2023; 19(1): 147. doi: 10.1186/s12917-023-03709-x
20. van Rijn SJ, Riemers FM, van den Heuvel D, Wolfswinkel J, Hofland L, Meij BP, et al. Expression stability of reference genes for quantitative RT-PCR of healthy and diseased pituitary tissue samples varies between humans, mice, and dogs. *Mol Neurobiol.* 2014; 49(2): 893-899. doi: 10.1007/s12035-013-8567-7
21. Kumar VE, Cherupanakal C, Catherine M, Kadiravan T, Parameswaran N, Rajendiran S, et al. Endogenous gene selection for relative quantification PCR and IL6 transcript levels in the PB-MC's of severe and non-severe dengue cases. *BMC Res Notes.* 2018; 11(1): 550. doi: 10.1186/s13104-018-3620-2
22. Lin XH, Chowdhury D, Seo SH. Inflammatory & apoptotic factor fluctuations associated with Japanese encephalitis virus infection in transgenic IFNAR1^{-/-} Mice. *Curr Microbiol.* 2024; 81(8): 239. doi: 10.1007/s00284-024-03759-w
23. Sahu AR, Wani SA, Saxena S, Rajak KK, Chaudhary D, Sahoo AP, et al. Selection and validation of suitable reference genes for qPCR gene expression analysis in goats and sheep under Peste des petits ruminants virus (PPRV), lineage IV infection. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 15969. doi: 10.1038/s41598-018-34236-7
24. Thompson D, Sorenson J, Greenmyer J, Brissette CA, Watt JA. The Lyme disease bacterium, *Borrelia burgdorferi*, stimulates an inflammatory response in human choroid plexus epithelial cells. *PLoS One.* 2020; 15(7): e0234993. doi: 10.1371/journal.pone.0234993
25. Walpole RE, Myers RH, Myers SL, Ye K. *Probability and statistics for engineers and scientists*; 8th ed. Upper Saddle River: Pearson Education; 2007.
26. Rogers-Broadway KR, Karteris E. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Exp Ther Med.* 2015; 10(4): 1261-1264. doi: 10.3892/etm.2015.2712
27. Hays A, Islam R, Matys K, Williams D. Best practices in qPCR and dPCR validation in regulated bioanalytical laboratories. *AAPS J.* 2022; 24(2): 36. doi: 10.1208/s12248-022-00686-1
28. Thermo Fisher Scientific. *QPCR optimization & troubleshooting guide*. URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Product-Guides/D13002~.pdf> [date of access: 15.09.2024].
29. Sandercock DA, Coe JE, Di Giminiani P, Edwards SA. Determination of stable reference genes for RT-qPCR expression data in mechanistic pain studies on pig dorsal root ganglia and spinal cord. *Res Vet Sci.* 2017; 114: 493-501. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.09.025
30. Schwarz AP, Malygina DA, Kovalenko AA, Trofimov AN, Zaitsev AV. Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol Cell Probes.* 2020; 53: 101611. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101611

Сведения об авторах

Ляпунова Наталья Андреевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nataly2193@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Хаснатинов Максим Анатольевич – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Данчинова Галина Анатольевна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: dan-chin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6705-3970>

Соловаров Иннокентий Сергеевич – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: keschass@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9936-5330>

Information about the authors

Natalia A. Liapunova – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: nataly2193@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Maxim A. Khasnatinov – Dr. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Galina A. Danchinova – Dr. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: dan-chin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6705-3970>

Innokentii S. Solovarov – Cand. Sc. (Biol.), Junior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: keschass@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9936-5330>