

Создание бицисторной конструкции рСМV-EGFP-2A-Luc2 для флуоресцентного и биолюминесцентного анализа клеток

Научный руководитель – Кондратьева Лия Германовна

Тарасенко Александра Игоревна

Студент (бакалавр)

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

РАН, Москва, Россия

E-mail: rassi09@rambler.ru

Визуализация отдельных клеток и клеточных популяций широко используется для изучения биологических процессов на молекулярном уровне и, в частности, при визуализации отдельных органов и тканей в организме лабораторных животных, а также изучения процессов метастазирования. Для этих целей применяются методы флуоресцентной микроскопии и биолюминесцентной визуализации. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки в зависимости от экспериментальной задачи. Для того, чтобы скомбинировать необходимые свойства каждой из систем визуализации для одновременных экспериментов *in vitro* и *in vivo*, можно использовать конструкции, кодирующие два репортерных белка под одним промотором [2]. Один из репортерных белков позволяет регистрировать флуоресценцию, а второй - биолюминесценцию в образцах.

В данной работе была получена конструкция, несущая последовательности, кодирующие зеленый флуоресцентный белок EGFP и люциферазу светлячка Luc2, соединенные последовательностью кодирующей 2A пептид вируса ящура из 20 аминокислот. Во время трансляции 2A пептид вызывает временную остановку работы рибосомы. Уже синтезированная часть белка отделяется от рибосомы, а с оставшейся части мРНК продолжается биосинтез [1]. В итоге образуется два целевых белка, на конце аминокислотной последовательности одного из которых находится дополнительные 20 аминокислот.

Функциональность полученной конструкции рСМV-EGFP-2A-Luc2 была изучена в условиях транзientной трансфекции линии клеток НЕК293 с использованием Lipofectamine® 2000. Через 48 часов после трансфекции проводили анализ продукции EGFP с помощью флуоресцентной микроскопии, путем измерения биолюминесценции оценивали продукцию Luc2, с помощью вестерн блоттинга определяли корректность процессинга 2A-пептида.

Содержание EGFP было сопоставимо в клетках, трансфицированных полученной плазмидой рСМV-EGFP-2A-Luc2 и контрольной плазмидой рEGFP-N1.

Относительная активность люциферазы, синтезированной с использованием плазмиды рСМV-EGFP- 2A-Luc2, превысила активность люциферазы при использовании контрольной плазмиды рСМV-Luc2 почти в два раза.

С помощью антител против EGFP в лизатах трансфицированных клеток детектировали белок размером 29 кДа. Это соответствует размеру белка EGFP (27кДа) и слитой с ним последовательности процессированного 2A-пептида (2 кДа). При этом нерасщепленного белка EGFP-2A-Luc2 обнаружено не было, что говорит о корректном расщеплении 2A-пептида.

Таким образом, мы получили генно-инженерную конструкцию, несущую новый репортерный ген EGFP-2A-Luc2, позволяющий достигать высоких уровней продукции EGFP и Luc2 в трансфицированных клетках. Такая система сочетает в себе преимущества как биолюминесцентной, так и флуоресцентной визуализации.

Источники и литература

- 1) Doronina VA, Wu C, de Felipe P, Sachs MS, Ryan MD, Brown JD Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon // Mol Cell Biol. 2008 V.28 №13 P. 4227-4239
- 2) Felipe P. de. Polycistronic viral vectors // Curr Gene Ther. 2002 V.2 №3 P. 355-378