

Получение культуры человеческих клеток HeLa S3 с платформой Landing Pad

Научный руководитель – Сергиев Пётр Владимирович

Денисова Е.Р.¹, Марьясина С.С.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия, *E-mail: evgeniya.denisova.1998@mail.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия, *E-mail: sofia.mariasina@yandex.ru*

Основой современных геномных исследований является интеграция в геном новых генно-инженерных конструкций. Чаще всего для этого используется вирусная трансдукция или трансфекция. Однако при этом интересующий фрагмент может встраиваться в произвольное положение генома, причем с высокой вероятностью - в нескольких копиях. В некоторых случаях это критично, например, при работе с библиотеками генов. В клеточных культурах млекопитающих данные проблемы призвана решить платформа Landing pad (LP) [1].

LP — «посадочная площадка», которая, будучи внедрена в геном, обеспечивает однокопийную сайт-специфическую рекомбинацию генетического материала, вводимого в клетку путём трансфекции. В геном интегрируется кассета, содержащая акцепторный сайт (AttP) и ген Vxb1-рекомбиназы (рис. 1). Также в конструкции имеются маркер устойчивости к бластицидину (Blast.) и ген синего флуоресцирующего белка (BFP) для проведения положительного или отрицательного отбора. Все эти гены находятся под тетрациклин-индуцибельным промотером. Для введения в геном конструкция инкорпорирована в лентивирусный вектор.

Ген, вводимый с помощью LP в геном, находится на другой плазмиде. Она содержит также ген устойчивости к пурамицину (Puго) и ген флуоресцирующего белка mCherry в качестве маркеров положительного и отрицательного отбора. За ними расположен терминатор, обеспечивающий «выключение» экспрессии Vxb1-рекомбиназы, Blast. и BFP после встраивания конструкции в геном.

В настоящей работе вставка платформы LP проводится в клеточную линию HeLa S3 — модификацию клеточной линии эпителиоидной карциномы шейки матки человека. Культуре свойственна высокая жизнеспособность и полусуспензионный характер роста (прикрепление ко дну и свободное пребывание в среде), что дает возможность быстро выращивать большой объем клеточной массы, используя колбы

В результате работы получена культура клеток человека HeLa S3, содержащая в геноме платформу LP. Вставка платформы подтверждена методами ПЦР, а также с помощью проточной цитометрии.

Работоспособность конструкции в полученных клетках HeLa S3 LP проверена экспериментально внедрением акцепторной плазмиды с модельным геном зеленого флуоресцирующего белка (GFP). После трансфекции существенная доля клеток обладала зеленой светимостью, что свидетельствует о высокой степени рекомбинации и, следовательно, об успешном внедрении функциональной платформы Landing Pad в геном клеток.

В дальнейшем полученная клеточная линия будет использована для создания генных библиотек.

Авторы выражают благодарность Matreyek К.А. за предоставление плазмиды. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №200400736.

Источники и литература

- 1) Matreyek К.А., Stephany J.J., Fowler D.M. A platform for functional assessment of large variant libraries in mammalian cells // Nucleic Acids Res. 2017; 45: e102.

Иллюстрации

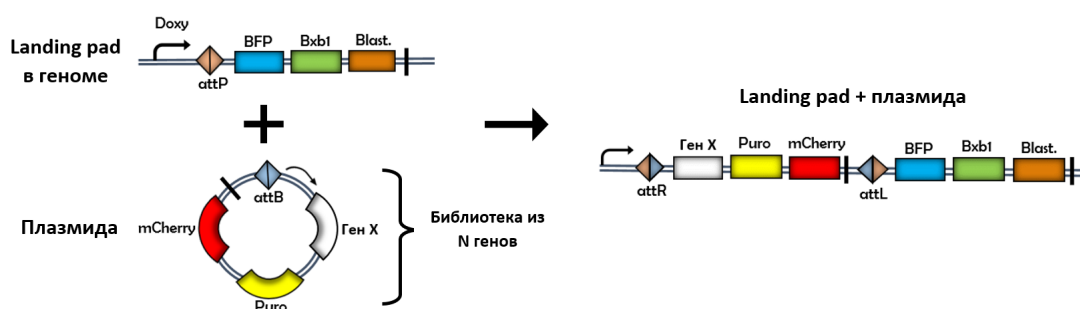


Рис. 1. Интеграция плазмиды с помощью Vxb1-рекомбиназы во встроенную в геном платформу Landing Pad.