

**Количественная детекция апоптоза в эукариотических клеточных линиях  
посредством рекомбинантного аннексина V, полученного по  
оптимизированной методике и конъюгированного с флуорохромом FITC**

**Научный руководитель – Земскова Марина Юрьевна**

***Новикова Наталья Игоревна***

*Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, Россия

*E-mail: nataliya.novikova2000@mail.ru*

Экспонирование фосфатидилсерина в поверхностный слой мембран эукариотических клеток, опосредуемое АТФ-зависимой транслоказой, является одним из ранних проявлений программируемой клеточной гибели. Аннексин V, эффективно связывающийся с отрицательно заряженными фосфолипидами и в частности с фосфатидилсерином, широко используется для количественной детекции апоптотических клеток после конъюгирования с флуорохромами. Однако стоимость коммерческих реагентов для определения апоптоза оценивается в 600-1000\$, что является серьезным ограничением для проведения исследований клеточной гибели.

Целью данной работы является разработка оптимизированной высокопроизводительной методики получения рекомбинантного аннексина V, меченного FITC, с последующей оценкой уровня специфичности связывания реагента с мембранами апоптотических клеток.

В экспрессионный вектор рЕТ-28а под контроль промотора фага Т7 был клонирован искусственно синтезированный ген hANXAV, обладающий оптимизированной структурой для экспрессии аннексина V в клетках E.coli. Высокоэффективная продукция целевого белка была получена в штамме E.coli BL21(DE3)/pANXA5-28а. Показано, что данный рекомбинантный белок находится преимущественно в растворимом состоянии. Очистка аннексина V проводилась посредством металл-хелатной хроматографии с последующим диализом. Препарат чистотой около 95% был конъюгирован с флуорохромом FITC, после чего очищен посредством анионообменной хроматографии.

Эффективность очищенного аннексина V-FITC детектировать апоптоз в популяции клеток эукариот оценивалась с использованием клеточных линий моноцитарных клеток человека (THP-1), рака молочной железы (MDAMB 231, MCF 7), рака простаты (LNCap, PC3), клеточной линии первичных моноцитов периферической крови свиньи и клеток селезенки свиньи (SSS). Индукция апоптоза осуществлялась с помощью инкубирования с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, стауроспорином или при клеточном голодании. Пробы клеточной суспензии были инкубированы с рекомбинантным аннексином V-FITC (0.2 - 10 мкг/мл) и проанализированы посредством проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии. Анализ показал, что полученный реагент позволяет количественно определять апоптоз в клеточной популяции с высокой степенью специфичности, и его эффективность сравнима с коммерческим препаратом (BD Bioscience). Однако необходим эмпирический подбор оптимальных концентраций аннексина V-FITC в случае каждой клеточной линии, что может быть обусловлено вариациями фосфолипидного состава мембран.

В результате была разработана высокопроизводительная методика получения аннексина V-FITC, выход белка в которой составил 280 мг с одного литра бактериальной культуры. При этом эффективность мечения полученного препарата в 16 раз превышает таковую коммерческого реагента. Следовательно, полученный нами рекомбинантный аннексин V, конъюгированный с FITC, может быть успешно применен при исследовании программируемой клеточной гибели клеток человека и животных.