

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУР ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТОК СО СТАБИЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА CAS9

И. Э. Куфко, Е. С. Покладок

icufko@gmail.com, katena.pokladok@mail.ru;

научный руководитель – Т. В. Романовская, кандидат биологических наук, доцент.

Методом котрансфекции с использованием клеток HEK293T, были получены лентивирусные частицы, несущие ген Cas9 и ген устойчивости к бластицидину. Их использовали для трансдукции клеточных культур HEK293T и Kasumi-1. В клеточных линиях, полученных после селекции, методом ПЦР была подтверждена экспрессия гена Cas9. Линии могут быть в дальнейшем использованы в экспериментах по нокауту различных целевых генов.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; котрансфекция; лентивирусная трансдукция; лентивирусный вектор; HEK293T; Kasumi-1.

ВВЕДЕНИЕ

Система CRISPR/Cas (CRISPR, от англ. Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats; Cas, от англ. CRISPR-associated) является удобным и надежным инструментом редактирования генома, позволяющим исследователям точно манипулировать конкретными геномными элементами и облегчающим выяснение функции целевого гена в биологии заболеваний. Для проведения нокаута целевого гена с помощью этой системы в клетках должны присутствовать неспецифическая нуклеаза Cas9 и программируемая последовательность небольшой РНК – обозначаемой как гидРНК, или gRNA, которая направляет Cas9 на расщепление ДНК. Таким образом генерируются двухцепочечные разрывы в целевых сайтах [3]. Последующий процесс репарации клеточной ДНК приводит к появлению изменений последовательности в виде вставок, делеций или замен в сайтах-мишенях. Мы поставили перед собой задачу получить культуры клеток человека, которые способны стабильно экспрессировать белок Cas9.

В нашем эксперименте использовались две клеточные линии. Одна из них – HEK293T – представляет собой immortalized линию эмбриональных клеток почки человека. Вторая линия – Kasumi-1, с 1991 года представляющая инструмент для изучения специфических молекулярных, морфологических, иммунофенотипических особенностей острого миелоидного лейкоза [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения цели работы был выбран метод трансдукции с применением лентивирусных векторов.

Для создания вирусных частиц была проведена котрансфекция клеток НЕК293Т с использованием трёх плазмид: lentiCas9-Blast (номер в банке плазмид Addgene – #52962) [4], несущей ген Cas9 и обеспечивающей устойчивость к антибиотику бластицидину, pCMV_dR8_91 и pMD2_G. Вспомогательным компонентом служил полиэтиленимин, добавленный к смеси плазмид в массовом отношении 2:1. Спустя 72 часа после трансфекции производился сбор среды, содержащей лентивирусные частицы. Концентрирование лентивирусных частиц производили посредством центрифугирования (16 ч, 16000g при температуре +4°C). Из 10 мл собранной среды получали 1 мл концентрированного раствора вирусов.

При проведении трансдукции в качестве вспомогательного реагента использовался Polybrene. Для Kasumi-1 была проведена дополнительно процедура спинокуляции (центрифугирование 90 мин, 800g при температуре 32°C) для повышения эффективности трансдукции.

Для отбора трансдуцированных клеток они были высеяны на селективную среду, содержащую бластицидин в концентрации 1 мкг/мл.

Верификация экспрессии гена Cas9 в полученных линиях проводилась с использованием стандартной ПЦР или ПЦР в реальном времени, а также электрофореза в агарозном геле. ПЦР проводили с использованием в качестве матрицы кДНК, полученной посредством реакции обратной транскрипции на выделенной из клеток РНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения культур клеток, экспрессирующих ген Cas9, проводили лентивирусную трансдукцию, согласно описанной выше методике. Клетки селектировали и подвергали дальнейшему анализу для подтверждения успешности эксперимента.

Клетки контрольной культуры линии НЕК293Т, не проходившие трансдукцию и, соответственно, не содержащие гена устойчивости к бластицидину, не адгезируются на пластике и не пролиферируют, что говорит об их гибели (рисунок 1).

Такая же разница в выживаемости клеток при обработке бластицидином наблюдается и для Kasumi-1: нетрансдуцированные клетки погибают, а клетки, полученные после трансдукции и прошедшие этап селекции, – устойчивы.

Выживаемость полученных клеточных линий стабильно сохранялась на протяжении более 2 месяцев, что соответствует более 20 раундам клеточных делений и говорит об интеграции гена устойчивости бластицидина в геном клеток. Подобные результаты позволяют говорить также о стабильной экспрессии и гена Cas9, расположенного

непосредственно рядом с геном устойчивости в переносимой конструкции.

Для подтверждения экспрессии в клетках культуры НЕК293Т гена Cas9 был поставлен ПЦР-тест. Для этого из клеток была выделена тотальная РНК, которая использовалась в качестве матрицы для синтеза кДНК. Далее была проведена амплификация кДНК со специфичными праймерами и электрофорез в агарозном геле, подтвердивший наличие гена Cas9 в РНК клеток и, следовательно, его экспрессию (рисунок 2). На 3 дорожке находится продукт ПЦР с праймерами к гену Cas9, здесь виден фрагмент, соответствующий ожидаемому размеру (113 п.н.); на 4 дорожке находится ДНК не модифицированных клеток НЕК293Т, выполнявшая функцию отрицательного контроля. ДНК в дорожках 1 и 2 служили положительным контролем: они содержат амплифицированный фрагмент (142 п.н.) клеточного гена «домашнего хозяйства» GAPDH.

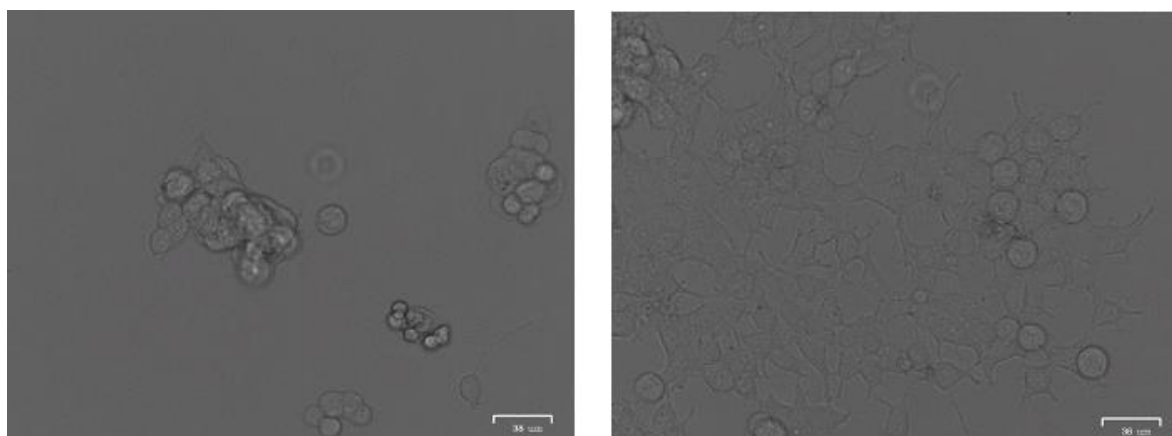


Рис. 1. Результаты микроскопического анализа культуры НЕК293Т/Cas9 на питательной среде, содержащей антибиотик бластицидин.

Слева – фотография клеток НЕК293Т не подвергавшихся трансдукции, справа – фотография клеток этой же линии, после трансдукции и селекции с бластицидином в течение 7 дней. Размер масштабной линейки – 38 мкм.

Для проверки экспрессии гена Cas9 в культуре Kasumi-1 была проведена ПЦР в реальном времени на полученной кДНК из стандартных клеток этой культуры и модифицированных – Kasumi-1/Cas9 (рисунок 3). В качестве положительного контроля были проведены реакции с праймерами для гена ТВР, конститутивно экспрессирующегося в клетках. Полученные данные ПЦР в реальном времени подтверждают экспрессию гена Cas9 в культуре Kasumi-1.

Таким образом, итогом работы стало получение двух клеточных линий, в геноме которых стабильно интегрирован ген Cas9. В дальнейшем эти линии могут быть использованы в разнонаправленных экспериментах

по нокауту генов. В частности, это позволит оценить роль некоторых генов в контроле выживаемости и пролиферации лейкозных клеток.

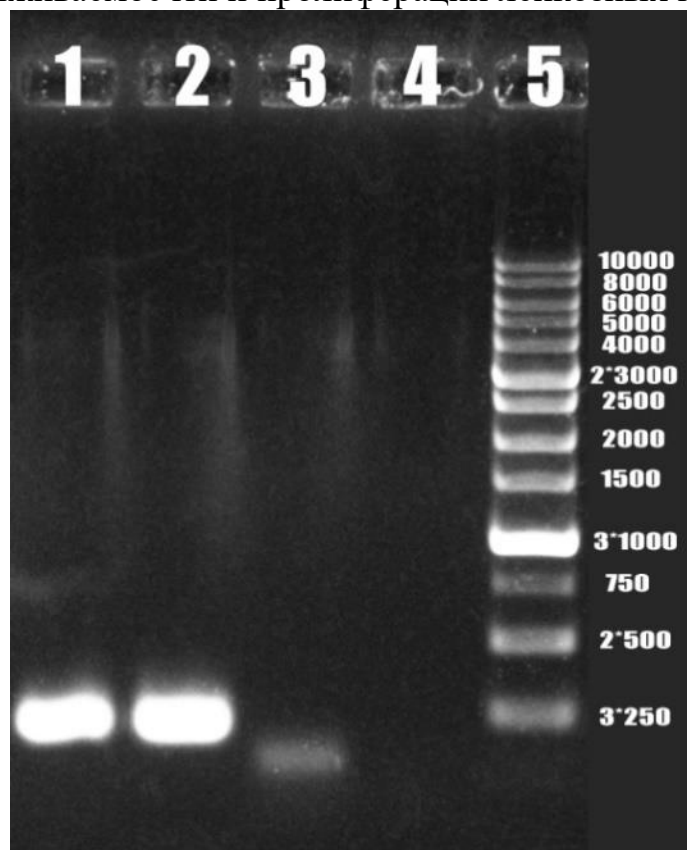


Рис. 2. Результаты электрофореза продуктов ПЦР кДНК HEK293T/Cas9

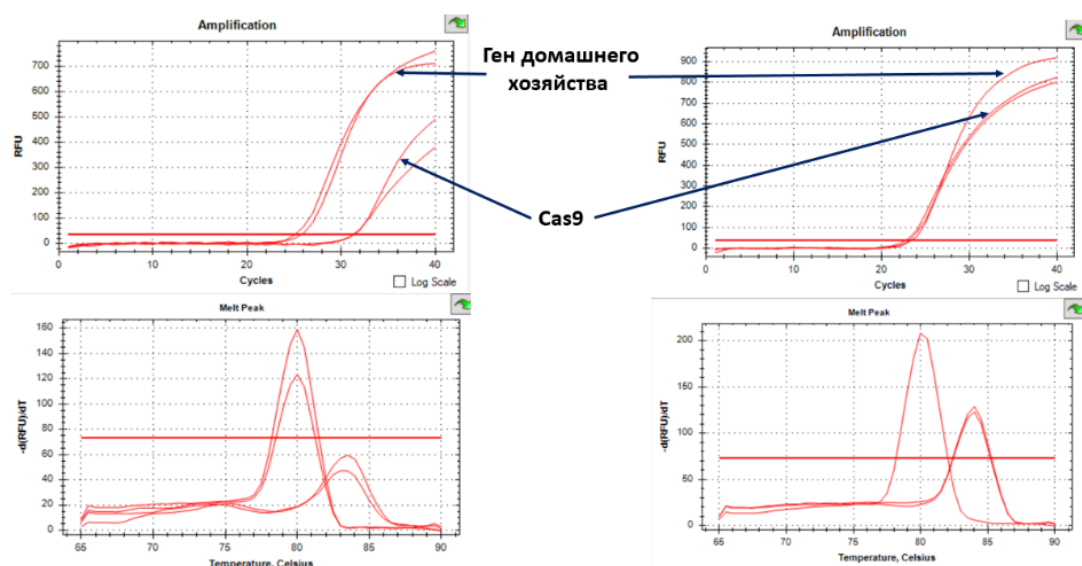


Рис. 3. Результаты ПЦР в реальном времени на кДНК Kasumi-1/Cas9.

Слева – данные для культуры без модификации, справа – данные для модифицированной культуры. Вверху – кривые амплификации, внизу - кривые плавления

Библиографические ссылки

1. Grossman, Z. Recombination between simian virus 40 and adeno-associated virus: virion coinfection compared to DNA cotransfection / Z. Grossman, E. Winocour, K.I. Berns // *Virology*. 1984. Vol. 134, № 1. P. 125-137.
2. Larizza, L. The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia / L. Larizza, I. Magnani, A. Beghini // *Leuk Lymphoma*. 2005. Vol. 46, № 2. P. 247-255.
3. Ma, Y. Genome modification by CRISPR/Cas9 / Y. Ma, L. Zhang, X. Huang // *FEBS J*. 2014. Vol. 281, № 23. P. 5186-5193.
4. Sanjana, N.E. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening / N.E. Sanjana, O. Shalem, F. Zhang // *Nat Methods*. 2014. Vol. 11, № 8. P. 783-784.