

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ИОННОГО КАНАЛА В КЛЕТКАХ НЕК293 ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

А. О. Муравицкая, С. С. Зуёнок, Е. А. Чернявская, В. В. Демидчик

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

Установление функциональных особенностей и механизмов регуляции ионных каналов растений является важной задачей биофизики растений. Для исследования ионных каналов применяются различные методы: электрофизиологические, молекулярно-генетические, биохимические. В последнее время все чаще используются подходы, включающие гетерологическую экспрессию ионных каналов, позволяющие исследовать особенности ионных токов через определенный канал в модельной системе [1]. Семейство каналов, активируемых циклическими нуклеотидами (CNGC), является одним из крупнейших семейств ионных каналов растений, однако в настоящее время особенности функционирования данных каналов у растений исследованы фрагментарно. В настоящей работе в качестве объекта исследования был избран ионный канал *A. thaliana* CNGC14, для которого ранее была предложена функция в качестве Ca^{2+} -опосредуемого триггера сигналов фитогормонов (ауксинов) и регуляции роста корней [2]. Целью работы являлось конструирование вектора для гетерологической экспрессии CNGC14 и других ионных каналов растений в культуре клеток почек эмбриона человека (НЕК 293). За основу был взят плазмидный экспрессионный вектор pcDNA3.1(+) размером 5428 п.о., содержащий сайты начала репликации для клонирования в клетках *E. coli* и в клетках млекопитающих, сильный промотор цитомегаловируса (CMV) и полилинкер в прямой ориентации. В качестве селективных маркеров выступали гены антибиотикорезистентности – *AmpR* (для отбора трансформированных клеток *E. coli* на среде с ампициллином) и *NeoR/KanR* (для отбора трансформантов среди клеток млекопитающих на среде с неомицином, канамицином или G418). В роли целевого гена выступала последовательность кДНК ионного канала CNGC14 *A. thaliana* (GenBank NM_001335940), слитая с последовательностью кДНК зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) через линкер, кодирующий 6 аминокислотных остатков глицина. Флуоресцентная метка необходима для визуализации экспрессии ионного канала и определения его локализации в клетке. Нуклеотидная последовательность растительного ионного канала предварительно была оптимизирована для экспрессии в животных клетках НЕК 293 с помощью сервиса VectorBuilder. Вставка целевой последовательности в вектор осуществлялась по сайтам рестрикции для ферментов *NheI* и *NotI*, расположенным в полилинкере. Данная генетическая конструкция позволяет экспрессировать растительный ионный канал AtCNGC14 в клетках линии НЕК293, что необходимо для проведения электрофизиологических исследований методом пэтч-кламп с целью измерения ионных токов через данный канал.

Библиографические ссылки

1. Wang Y. Functional characterization of plant ion channels in heterologous expression systems // Plant Electrophysiology. 2012. Vol. 13. P. 301–321.
2. The cyclic nucleotide-gated channel CNGC14 regulates root gravitropism in *Arabidopsis thaliana* / H.-W. Shih [et al.] // Curr. Biol. 2015. Vol. 25, iss. 23. P. 3119–3125.