

## Использование системы рекомбинации Flp/FRT для создания универсальной клеточной линии

Научный руководитель – Соловьев Валерий Владимирович

*Козлова Екатерина Сергеевна*

*Студент (магистр)*

Пушчинский государственный естественно-научный институт, Московская область, Россия

*E-mail: Kozlovaes@biocad.ru*

Одним из популярных инструментов для генетической инженерии клеточных линий являются системы сайт-специфической рекомбинации, которые позволяют производить обмен цепей ДНК между определенными последовательностями [1, 2]. Такой обмен (рекомбинация) возможен благодаря особым ферментам - рекомбиназам, которые способны узнавать определенные сайты ДНК, вносить разрыв, переставлять фрагменты и снова соединять цепи ДНК [1].

Преимуществом данного подхода является то, что последовательность трансгена встраивается в строго определенное место в геноме, т.о. все клетки в получаемом пуле имеют одинаковый генотип и, как следствие, схожий уровень экспрессии целевых генов. Это позволяет упростить и ускорить процесс создания генетически модифицированных клеточных линий.

Целью данной работы являлось создание универсальной реципиентной клеточной линии для получения модифицированных клеточных линий с помощью Flp/FRT системы сайт-специфической рекомбинации.

Для выполнения работы, была использована плаزمиды, содержащая между двумя FRT сайтами ген рецептора 4-1BB, ген белка GFP под контролем NF- $\kappa$ B-зависимого промотора (ген-репортер), и ген антибиотикорезистентности. В качестве модельной была выбрана широко применяемая линия клеток почки эмбриона человека HEK293. Клетки трансфицировали плазмидой, селектировали на антибиотике и клонировали. Лучший клон отбирали по уровню 4-1BB на поверхности клеток и по корректности работы репортерного гена. Моноклонность вставки в геном подтверждали методом ПЦР в реальном времени.

Затем в клетках транзientно экспрессировали Flp рекомбиназу для вырезания из генома кассеты между FRT сайтами с сохранением одного FRT сайта. Удаление кассеты подтверждали методом ПЦР.

Апробацию методики ускоренного получения модифицированной клеточной линии проводили котрансфекцией клеточной линии плазмидой, содержащей ген Flp-рекомбиназы, и плазмидой, содержащей ген белка RFP, и ген антибиотикорезистентности без промотора. После селекции на антибиотике, полученный пул клеток имел одинаковый уровень экспрессии RFP. Сделан вывод об успешном получении моноклональной клеточной линии HEK293 с FRT-сайтом в геноме, позволяющим эффективно рекомбинировать в него различные генетические конструкции.

### Литература

1. Coates, C.J., Kaminski, J.M., Summers, J.B., Segal, D.J., Miller, A.D., Kolb, A.F. Site-directed genome modification: derivatives of DNA-modifying enzymes as targeting tools. Trends in Biotechnology. 2005, 23, 407-19.

2. Kolb, A.F. Genome Engineering Using Site-Specific Recombinases. Cloning & Stem Cells. 2002, 4, 65-80.

