

УДК 57.085.23

СОЗДАНИЕ КЛЕТОК С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ СЕНСОРАМИ***О.А. Рогачевская****Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, Россия*

Клеточные линии, на высоком уровне экспрессирующие различные экзогенные рекомбинантные белки широко используются в мировой практике для изучения различных аспектов рецепции и внутриклеточной сигнализации. Линии клеток, экспрессирующих рецепторы или ионные каналы, могут использоваться как модель для доклинических испытаний лекарственных средств, или как клеточный биосенсор при изучении секреции соответствующих активных веществ клетками разных тканей. В частности, ранее в нашей лаборатории были получены линии клеток СНО, экспрессирующие ионные каналы P2X2 (модель для испытания новых анальгетиков и биосенсор АТФ) и экспрессирующие рецептор 5HT2C (биосенсор серотонина).

Актуальной задачей доклинических исследований является так же максимально полный анализ внутриклеточной сигнализации, инициируемый потенциальными лекарственными средствами. Для решения этой задачи в настоящее время существуют генетически кодируемые молекулярные сенсоры, позволяющие осуществлять одновременный мониторинг в режиме реального времени нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов. Так, в нашей лаборатории осуществлен одновременный мониторинг динамики изменений внутриклеточного Ca^{2+} и cAMP в клетках НЕК 293 под действием различных внеклеточных лигандов с помощью микрофотометрии.

Работы такого плана можно осуществлять на клетках, временно экспрессирующих целевой белок, однако оптимальным вариантом является получение моноклональных клеточных линий с постоянным высоким уровнем экспрессии белка интереса практически во всех клетках. Для получения таких линий нами используется следующий экспериментальный протокол: получение и наработка плазмиды, несущей участок гена, кодирующий белок интереса; химическая трансфекция клеток трансфекционным агентом и плазмидным вектором; наращивание или отбор клеток в присутствии селективного антибиотика; отбор клеток (1 клетка в одну лунку 96 луночного планшета) с помощью клеточного сортера по интенсивности флуоресценции; наращивание клеточных клонов; отбор лучших клонов с помощью физиологического анализа клеток; депонирование полученных клеточных линий. Данный подход достаточно длителен и трудоемок, однако полученные в процессе моноклональные клеточные линии характеризуются не только высоким уровнем экспрессии белка интереса, но и высокой степенью однородности клеточной популяции, что является немаловажным аспектом при исследовании внутриклеточных процессов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-01035 (рук. О.А. Рогачевская)