

Новая множественно маркированная линия клеток — производная от СНО-К1

В. А. Кордюм, Е. К. Топорова, О. В. Окунев, Я. А. Похолоenko,
Е. М. Сухорада, Т. А. Рубан, В. И. Андриенко, Д. М. Иродов

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Клеточная линия СНО-К1 (ауксотрофная по пролину) была последовательно трансфицирована плазмидами pEGFP-C1 и pTR-GT60. После отбора трансформантов на селективных средах получена сублиния, генотип которой можно записать как pro⁻, neo⁺, gfp⁺, tkn⁺, hph⁻. Клетки этой линии обладают следующими свойствами: они ауксотрофны по пролину, устойчивы к антибиотикам G-418 и гистамицину, чувствительны к действию ганцикловира, флуоресцируют в зеленой области спектра при возбуждении ультрафиолетовым излучением.

Введение. Маркированные клеточные линии широко используют в биологии при решении многих задач как фундаментальных научных, так и прикладных технологических. Используя различные системы селекции из постоянных и первичных клеточных линий, выделены разные субклоны ауксотрофов, термочувствительных вариантов, а также клоны, обладающие устойчивостью к ядам и антибиотикам.

В 1968 г. предложен новый метод получения некоторых типов ауксотрофных мутантов [1, 2]. В его основе лежит способность растущих клеток включать в свою ДНК аналог тимидина 5-бромдезоксинуридин (БдУ). Предполагается, что общая популяция клеток имеет несколько ауксотрофов, возникающих в результате спонтанных мутаций или индуцированных мутагеном. Смешанную популяцию клеток обрабатывают БдУ в условиях неполной среды, на которой могут расти и включать БдУ только прототрофы: их убивают, облучая обычной флуоресцентной лампой. При переносе облученных клеток на среду, не содержащую БдУ и обогащенную элементами питания, получают ауксотрофные мутанты. Такие мутанты стабильны и имеют низкий уровень реверсий, что делает их

полезными для широкого спектра генетических исследований. Описанный методологический подход существенно расширил возможности получения мутантных линий. Вместе с тем маркирование клеточных линий по различным и в то же время простым в распознавании признакам остается достаточно сложной задачей.

Очень удобными в работе являются маркеры устойчивости к токсическим продуктам. Ряд генов, обеспечивающих подобную устойчивость, клонирован и широко используется во всем мире. Во многих работах традиционно используют репортерные гены, обуславливающие либо селективные маркеры (например, неомицинтрансферазу), либо гены, кодирующие удобные для идентификации ферменты (ген β -галактозидазы *Escherichia coli*), продукты которых могут быть легко визуализированы. Однако применение только этих маркеров имеет существенные ограничения, так как селекция по устойчивости требует продолжительного времени, а рост на среде с токсическими агентами часто вызывает непредсказуемые изменения в отобранной клеточной популяции.

Процедуры цитохимического окрашивания (в случае применения энзиматических маркеров) неизбежно повреждают клетки и затрудняют отбор трансгенположительных клеток. Таким образом, «идеальные» маркеры должны кодировать белки, которые легко тестируются без повреждающих про-

© В. А. КОРДЮМ, Е. К. ТОПОРОВА, О. В. ОКУНЕВ,
Я. А. ПОХОЛЕНКО, Е. М. СУХОРАДА, Т. А. РУБАН,
В. И. АНДРИЕНКО, Д. М. ИРОДОВ, 2003

цедур окрашивания и фиксации клеток. Такими маркерами стали гены «цветных» флуоресцирующих белков [3].

Выделенный из природно биолюминесцентного организма (медузы *Aequorea victoria*) ген зеленого флуоресцирующего белка GFP (green fluorescent protein) при решении многих задач имеет целый ряд преимуществ перед другими используемыми маркерными молекулами. Применение его в качестве маркера в работе с широким кругом гетерологичных организмов *in vitro* и *in vivo* не требует субстратов или кофакторов. Этот белок нетоксичен и стабилен, визуализируется без повреждения клеток. Белок GFP представляет собой димер, мономер которого имеет молекулярную массу ≈ 27 кДа. Его небольшие размеры позволяют легко встраивать соответствующий ген в различные векторные конструкции для переноса в клетки-мишени и, таким образом, проводить мониторинг экспрессии генов, изучать эффективность трансфекционных процедур и т. д. Метод выявления флуоресценции GFP достаточно прост. Для этого необходим лишь люминесцентный микроскоп и соответствующая пара интерференционных фильтров, с помощью которых селективно выделяют узкую спектральную область длин волн: первый — из спектра источника света, а второй — из люминесцирующего препарата клеток. Для EGFP (белок GFP с усиленной флуоресценцией) пик возбуждения хромофора приходится на 470 нм, а излучение флуоресценции имеет максимум при длине волны 509 нм.

В настоящее время в литературе описано несколько удачных векторов экспрессии GFP. Используют их и для различных исследований на клеточных культурах. Но наличие клонированных генов и хороших векторных молекул само по себе еще не создаст удобных для работы маркированных клеточных линий — это является лишь хорошей предпосылкой для их получения.

Поэтому, несмотря на обилие клеточных линий в коллекциях культур, среди них очень мало простых в использовании и содержащих одновременно несколько четких отличительных признаков. Получение таких линий является актуальной задачей, способствующей развитию как фундаментальных, так и прикладных исследований.

В нашей работе в качестве исходной выбрана линия клеток китайского хомячка СНО. Одна из ее производных — СНО-K1 несет потенциально удобный маркер идентификации — ауксотрофность по пролину. Однако этот маркер не является селективным. Но если добавить к нему другие маркеры, в том числе и селективные, то можно получить уникальную, высокоинформативную в работе ли-

нию клеток. Поэтому именно СНО-K1 и послужила исходным материалом.

Материалы и методы. *Клетки.* Культура СНО-K1 получена из Российской коллекции клеточных культур (Санкт-Петербург). Клетки данной линии являются эпителиеподобными по морфологии. Кариотип: $2n = 22$, с возможными вариациями в пределах 16—22 хромосом. Модальное число хромосом — 20. Число маркеров при дифференциальном окрашивании — 12 [4].

Клетки выращивали в питательной среде, состоящей из 90 % среды F10 («Sigma», США) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Генном», Украина). Сыворотку перед употреблением инактивировали прогреванием на протяжении 30 мин при температуре 56—60 °С. В среду добавляли 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина («Киевмедпрепарат», Украина). При пересеве клетки снимали с поверхности стекла или пластика 0,25 %-м раствором трипсина и 0,02 %-м раствором версена (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия) в соотношении 1:1. Клетки культивировали при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 .

Плазмиды. Плазмидную ДНК выделяли и очищали в соответствии с методами, описанными Маниатисом и соавт. [5]. Для трансфекции клеток СНО-K1 pro^- использовали плазмиду *pEGFP-C1* (CLONTECH) (рис. 1). Поскольку данная плазида не содержит сайтов, обеспечивающих репликацию в обычных эукариотических клетках, частота ожидаемых стабильных трансформантов невелика. Однако благодаря такой конструкции плазмиды все они могут содержать селективные маркеры, кодируемые плазмидой, только в интегрированной в хромосому форме. Для отбора использовали ген неомидинтрансферазы, обеспечивающий устойчивость к антибиотику G-418, который также может быть дополнительным маркером.

Результаты и обсуждение. Мутанты (если они не делеционные, в том числе и по признаку отсутствия роста на питательных средах без пролина) часто ревертируют. В результате при длительном ведении таких линий без селекции ревертанты неизбежно накапливаются. Проверка музейной культуры СНО-K1 показала, что она содержит 25—30 % клеток, способных расти без пролина. Учитывая, что СНО-K1 получена очень давно, такое соотношение ревертантов и мутантов, возможно, является равновесным.

Полученная культура была расчищена перед работой до гомогенной популяции по маркеру pro^- . Для этого клетки каждого отдельного клона, выросшего на среде с пролином, рассевали на среды,

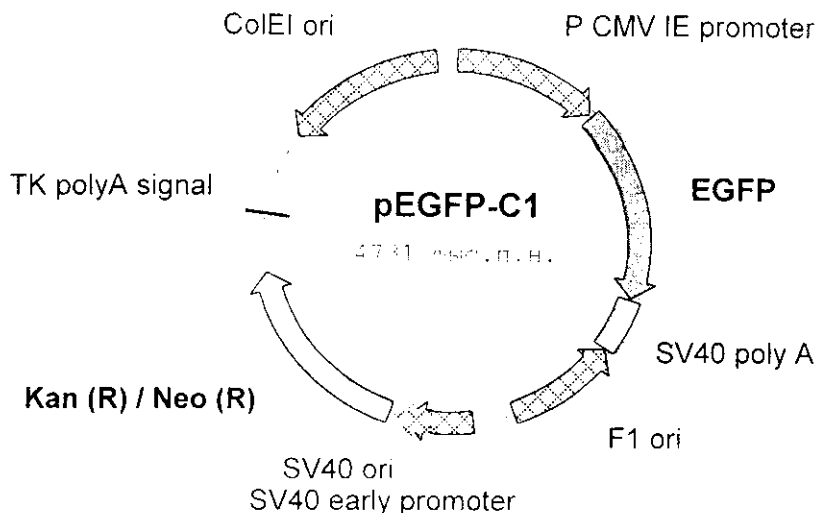


Рис. 1. Карта-схема рекомбинантной плазмиды *pEGFP-C1*: *PCMVIE* — ранний промотор/энхансер цитомегаловируса человека; *Neo(R)* — ген неомицинофосфотрансферазы; *EGFP* — мутантный ген зеленого флуоресцирующего белка с усиленной флуоресценцией; *SV40polyA* — сигнал полиаденилирования SV40

содержащие и не содержащие пролин. Такую процедуру повторяли несколько раз. В дальнейшей работе использовали потомство лишь тех клонов, которые не росли на среде без пролина.

Следует отметить, что, по-видимому, в результате длительного хранения в музеях исходная линия, кроме гетерогенности по способности расти на средах с пролином и без него, характеризовалась как различием морфологических признаков клеток, так и гетерогенностью колоний (по их форме и размерам). Анализ этих характеристик будет представлен в следующем сообщении. Таким образом, расчищенная линия имела четкий маркер pro^- как стабильно проявляемый признак и ее можно записать как СНО-K1 pro^- .

Клетки трансфицировали с использованием реагента ExGenTM500 («Fermentas», Литва), представляющего собой полиэтиленимин (ПЭИ) в форме линейных молекул массой 22 кДа. Эти молекулы имеют в своем составе большое количество катионных остатков, в связи с чем способны хорошо адсорбировать на себя ДНК за счет электростатических взаимодействий и благодаря этому переносить гены. Образованные ExGenTM500 комплексы с ДНК оседают на поверхности клеток и проникают в клетку путем эндоцитоза [6]. Трансфекцию проводили согласно протоколу, предлагаемому фирмой-изготовителем.

Для трансфекции использовали состав из трансформирующей ДНК в количестве 2 мкг с 6,6 мкл ExGenTM500 на 100 тыс. клеток. Трансфицирующую смесь наносили на клетки через 24—48 ч после посева их на чашки Петри. Время контакта клеток с комплексом ExGenTM500—ДНК составляло от 30 мин до 2 ч при температуре 37 °С. Затем трансфицирующую смесь сливали, сменяя ее

на ростовую среду. После культивирования в течение 48—72 ч опытные культуры переводили в селективные условия. Селективная среда содержала 80 % среды F10, 20 % эмбриональной телячьей сыворотки и 1000 мкг/мл антибиотика G-418.

После трансфекции клеток СНО-K1 pro^- плазмидой *pEGFP-C1* получили сублинию, генотип которой можно записать как СНО-K1, pro^- , neo^+ , gfp^+ . Клетки этой сублинии обладают следующими свойствами: они ауксотрофны по пролину (отсутствует ген, ответственный за синтез пролина, вследствие чего клетки не могут расти на средах, лишенных указанной аминокислоты), устойчивы к G-418 (способны к росту в присутствии этого антибиотика в концентрации 1000 мкг/мл), а также характеризуются флуоресценцией в зеленой части спектра (длина волны 509 нм), возбуждаемой ультрафиолетовым излучением с длиной волны 470 нм (рис. 2). Клетки имеют неодинаковую светимость даже в пределах одной колонии. Возможно, это связано с тем, что они находятся на разных этапах клеточного цикла. Вероятно также и наличие каких-то иных факторов, обуславливающих неоднородность свечения, что будет в дальнейшем дополнительно исследовано.

Далее клетки этой линии трансфицировали плазмидой *pTR-GT60*, содержащей два маркерных гена: ген тимидинкиназы вируса герпеса и ген устойчивости к гигромицину. Схема конструирования плазмиды *pTR-GT60* приведена на рис. 3. Из плазмиды *pGT60mIL12* («InvivoGen», США) был переклонирован *Eco1051-XhoI*-фрагмент в эукариотический экспрессионный вектор *pTR-UF*, любезно предоставленный д-ром С. Золотухиным (США). Особенностью данной конструкции является использование IRES-сайта внутреннего связывания

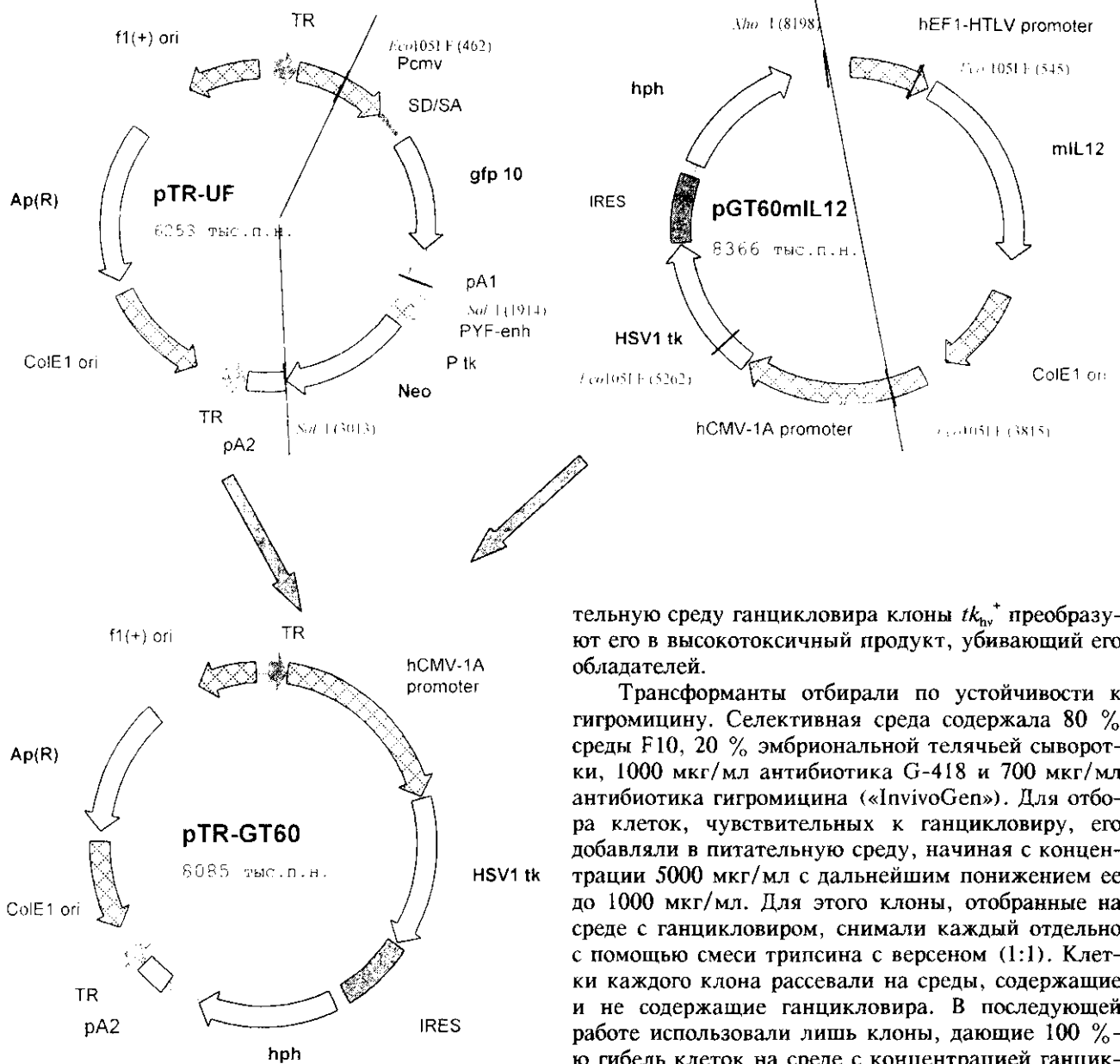


Рис 2. Схема получения рекомбинантной конструкции *pTR-GT60*: *TR* — инвертированные терминальные повторы аденоассоциированного вируса; *hCMV-1A promoter* — ранний промотор цитомегаловируса человека с интроном *A*; *HSV1 tk* — ген тимидинкиназы вируса герпеса 1 типа; *IRES* — внутренний связывающий рибосому сайт вируса энцефаломиокардита; *hph* — ген устойчивости к гигромицину

рибосом. В результате с одного промотора считываются два гена — тимидинкиназы (tk_{nv}) (первый) и устойчивости к гигромицину (*hph*) (второй). Ген герпесвирусной тимидинкиназы является потенциальным суицидным геном. При добавлении в пита-

тельную среду ганцикловира клоны tk_{nv}^+ преобразуют его в высокотоксичный продукт, убивающий его обладателей.

Трансформанты отбирали по устойчивости к гигромицину. Селективная среда содержала 80 % среды F10, 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1000 мкг/мл антибиотика G-418 и 700 мкг/мл антибиотика гигромицина («InvivoGen»). Для отбора клеток, чувствительных к ганцикловиру, его добавляли в питательную среду, начиная с концентрации 5000 мкг/мл с дальнейшим понижением ее до 1000 мкг/мл. Для этого клоны, отобранные на среде с ганцикловиром, снимали каждый отдельно с помощью смеси трипсина с версеном (1:1). Клетки каждого клона рассевали на среды, содержащие и не содержащие ганцикловира. В последующей работе использовали лишь клоны, дающие 100 % ю гибель клеток на среде с концентрацией ганцикловира 1000 мкг/мл.

После трансфекции клеток CHO-K1, pro^- , neo^R , gfp^+ плазмидой *pTR-GT60* получена сублиния, генотип которой можно записать как CHO-K1, pro^- , neo^+ , gfp^+ , tk_{nv}^+ , hph^+ .

Эти клетки обладали следующими свойствами: они ауксотрофны по пролину, устойчивы к антибиотикам G-418, устойчивы к антибиотику гигромицину, но одновременно чувствительны к действию ганцикловира, флуоресцируют в зеленой части спектра при возбуждении ультрафиолетовым излучением. Клетки этой линии культивируются на среде F10 с добавлением 10 % эмбриональной

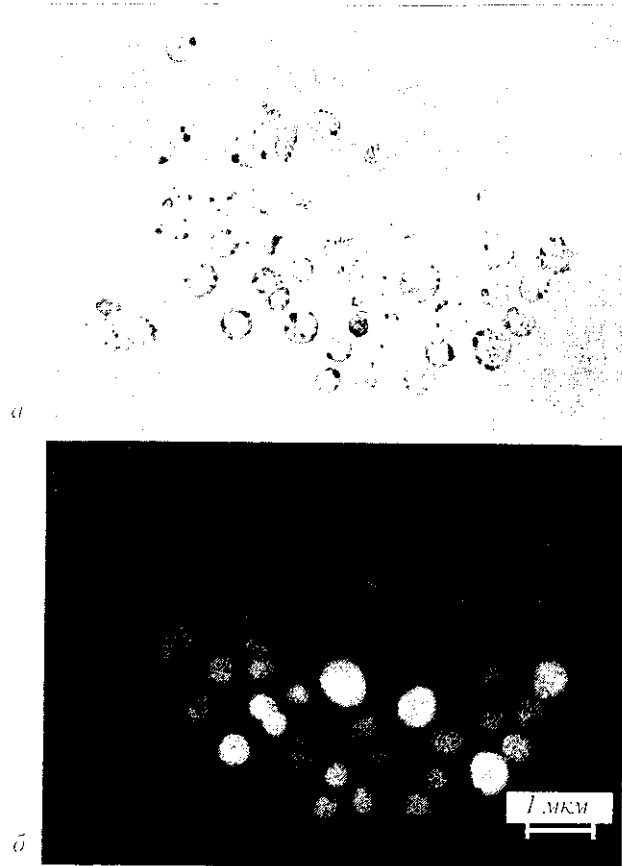


Рис. 3. Колония клеток CHO pro^{-} , neo^{R} , gfp^{+} : а — клетки в проходящем свете; б — люминесценция клеток при освещении их светом с длиной волны 470 нм. $\times 200$

телячьей сыворотки, 1000 мкг/мл антибиотика G-418 и 700 мкг/мл антибиотика гигромицина.

При добавлении в эту среду 1000 мкг/мл ганцикловира («Сумевене», Швейцария) происходит 100 %-я гибель клеток. При анализе люминесценции колоний после селекции их на среде с пролином с G-418 и гигромицином реверсии обнаружены не были. Это даст основание оценить частоту реверсии как минимум ниже 10^{-6} .

Таким образом, получена новая линия клеток млекопитающих с пятью четкими маркерами, удобными как для положительной и отрицательной селекции, так и визуализации.

V. A. Kordyum, E. K. Toporova, O. V. Okunev, Y. A. Pokholenko, E. M. Suchorada, T. A. Ruban, V. I. Andrienko, D. M. Irodov

Novel cell line with multiple markers, derivative of CHO-K1

Summary

A cell line CHO-K1/pro has been consecutively transfected with plasmids pEGFP-C1 and pTR-GT60. A subline with genotype pro^{-} , neo^{R} , gfp^{+} , tk_{hv}^{-} , hph^{+} has been obtained after selection in the selective media. The cells are auxotrophic mutants deficient in proline, resistant to antibiotics G-418 and hygromycin B, sensitive to Ganciclovir and produce greenish fluorescence when irradiated with long ultraviolet light.

V. A. Кордюм, О. К. Топорова, О. В. Окунев, Я. О. Похоленко, Е. М. Сухорада, Т. А. Рубан, В. І. Андриенко, Д. М. Іродов

Нова множинно маркована лінія клітин, похідна від CHO-K1

Резюме

Клітинну лінію CHO-K1 (ауксотрофна за проліном) послідовно трансформовано плазмідями pEGFP-C1 та pTR-GT60. Після відбору трансформантів на селективних середовищах одержано сублінію, генотип якої можна записати як pro^{-} , neo^{R} , gfp^{+} , tk_{hv}^{-} , hph^{+} . Клітини цієї лінії мають такі властивості: вони ауксотрофні за проліном, стійкі до дії антибіотиків G-418 та гігромицину, чутливі до дії ганцикловіру, флуоресціюють у зеленій частині спектра при збудженні ультрафіолетовим випроміненням.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Puck T. T., Cieciura S. J., Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects // J. Exp. Med.—1958.—108.—P. 945—955.
2. Kao F. T., Puck T. T. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1968.—60.—P. 1275—1281.
3. Топорова Е. К., Іродов Д. М., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Козел Ю. Н., Андриенко В. И., Новикова С. Н., Кордюм В. А. Использование генов флуоресцирующих белков для визуализации экспрессии генов в живых клетках *in vitro* и *in vivo* // Новые информационные технологии в медицине и экологии. X юбилейная международная конференция и дискуссионный научный клуб: Труды.—Ялта; Гурзуф, 2002.—С. 301—303.
4. Catalogue Russian cell culture collection (RCCC).—St. Petersburg; OMSK, 1999.—80 p.
5. Godley W. T., Wu K. K., Mikos A. G. Poly (ethyleneimine) and its role in gene delivery // J. Control. Release.—1999.—60. P. 149—160.
6. Маннатиш Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—545 с.

УДК 87.086.8

Надійшла до редакції 12.11.02