

С. М. Ландау, Л. И. Коломиец,
А. В. Тихонов, А. Н. Полоцкая, В. П. Адлер

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВРЕМЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ХЛОРАМФЕНИКОЛ-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК CV1

В условиях одновременного введения в культуру клонированных млекопитающих обезьяньего циркуляризирующего вируса 40 и рекомбинантных плазмид с регуляторным районом SV40 показано усиление экспрессии модельного гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT), находящегося в рекомбинантном векторе под промотором SV40.

К настоящему времени достаточно хорошо разработаны и в ряде случаев практически используются прокариотические системы для экспрессии эукариотических генов, кодирующих белки, представляющие значительный интерес для медицины и народного хозяйства. Однако, хотя такие системы просты и легко воспроизводимы, прокариоты неспособны выполнять многие посттрансляционные модификации, включая гликозилирование и энзиматический процессинг, необходимые для продуцирования аутентичных биологически активных эукариотических белков. Кроме того, прокариоты не могут сами удалять интроны из транскрибированных эукариотических генов и требуют их удаления из генов на уровне ДНК для экспрессии функциональных белков. В то же время вырезание интронов, содержащих регуляторные элементы генов, ведет к снижению экспрессии.

Эукариотические хозяева способны обеспечить механизмы, осуществляющие указанные модификации, однако вопросы функционирования рекомбинантных ДНК в эукариотической системе далеки от ясности и во многом нуждаются в дальнейшем изучении.

В наших предыдущих исследованиях предложена система трансфекции эукариотических векторов на основе вируса SV40, обеспечивающая индукцию максимальных уровней репликации этих рекомбинантных векторов в клетках млекопитающих [1—3]. Известно, что реплицирующиеся молекулы ДНК являются наилучшими матрицами для транскрипции [4]. Мы полагаем, что в условиях, при которых в клетках млекопитающих происходит оптимальная амплификация рекомбинантных плазмид, следует ожидать интенсификацию экспрессии генов, находящихся под промотором SV40 в рекомбинантных векторах.

Для оптимизации в культурах клеток млекопитающих уровня экспрессии генов, находящихся под ранним промотором SV40 в составе рекомбинантных плазмид, нами проведено сравнительное изучение экспрессии модельного гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT-гена) в культуре клеток CV1.

Достаточно хорошо изученный CAT-ген обуславливает устойчивость бактерий к хлорамфениколу. Для него разработан высокочувствительный метод определения соответствующей ферментативной активности. Процедура регистрации энзиматической активности хлорамфеникол-ацетилтрансферазы основана на использовании радиоактивного субстрата ¹⁴C-хлорамфеникола с последующим анализом ацетилированных продуктов реакции с помощью тонкослойной хроматографии.

Представляет интерес тот факт, что кодирующая область CAT-гена невелика (700 пар нуклеотидов), следовательно, векторы, несущие этот ген, могут быть легко модифицированы в нужных целях. В то же время экспрессия бактериального гена CAT в клетках млекопитающих может служить тестом на активность промоторов в эукариотических векторах [5, 6].

В работе была использована плаزمида *pSV2cat* [7], содержащая бактериальный ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы под ранним про-

мотором вируса SV40 и обладающая «ядовитыми» последовательностями. Трансфекцию проводили в культуре клеток CV1 во флаконах объемом 50 мл после нарастания монослоя (10^6 клеток). Плазмидную ДНК (3—5 мкг) в составе кальций-фосфатного преципитата вводили в культивируемые CV1-клетки. Непосредственно перед трансфекцией рекомбинантной ДНК культура клеток была инфицирована вирусом SV40 в соответствующих вариантах опыта.

Для исследований использовали вирус SV40 с титром 10^6 БОЕ/мл по 700 мкл на 50-мл флакон. Клетки снимали на 2-й и 3-й дни посттрансфекции, лизировали 3-кратным замораживанием-оттаиванием и

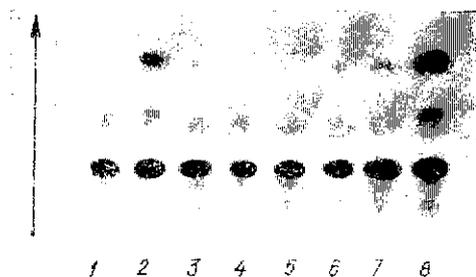


Рис. 1. Выявление экспрессии САТ-гена рекомбинантной плазмидой *pSV2cat* в культуре клеток CV1. Экстракты для реакции ацетилирования 14 С-хлорамфеникола приготовлены из CV1-клеток, трансфицированных: 3, 5 — только плазмидой *pSV2cat*; 2, 6, 7 — *pSV2cat* в присутствии вируса SV40; 1, 4 — не трансфицированные клетки; 8 — стабильно трансформированные *pSV2cat* клетки

центрифугировали. Надосадочную жидкость применяли для выявления хлорамфеникол-ацетилтрансферазной активности [7]. При постановке реакции определения САТ-активности пробы унифицировали по количеству общего белка, которое регистрировали в надосадочных жидкостях.

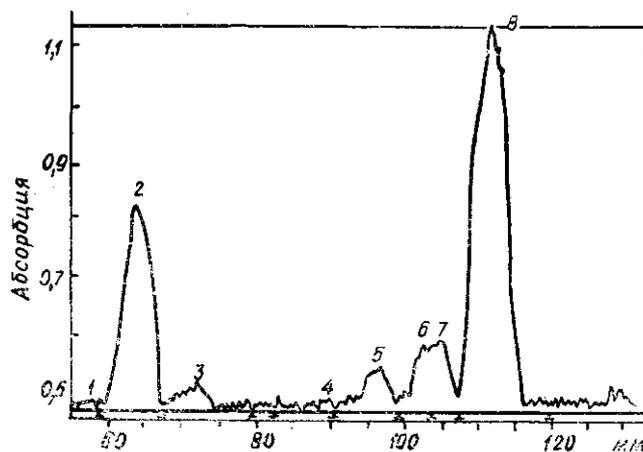


Рис. 2. Денситограмма пятен ацетилированных форм хлорамфеникола, полученных в результате энзиматической активности САТ, экспрессируемой в культуре клеток CV1. Последовательность пиков в соответствии с расположением пятен рис. 1

тях исследуемых гомогенатов клеток по методу Брэдфорда [8]. Образцы хроматографировали на пластинках с силикагелем для тонкослойной хроматографии («Merck», ФРГ) в системе хлороформ:этанол (95:5). Полученные радиоавтографы сканировали на денситометре «LKB Ultrosan XL» (Швеция).

Результаты опытов по сравнительному изучению экспрессии гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы в культуре клеток CV1 представлены на рис. 1 и 2.

В необработанных плазмидой культурах клеток (отрицательный контроль, рис. 1, дорожки 1, 4) САТ-активность обнаружена не была. Продукты ацетилирования 14 С-хлорамфеникола были выявлены на второй (рис. 1, дорожки 6, 7) и третий дни (рис. 1, дорожка 2) посттрансфекции при введении плазмиды совместно с вирусом SV40 и толь-

ко на третий день посттрансфекции — при отсутствии вируса (рис. 1, дорожка 3). На дорожке 8 представлен материал, служивший положительным контролем в наших экспериментах — лизат клеток, стабильно трансформированных по САТ-гену. Следует отметить, что в надосадочной жидкости гомогената этих клеток концентрация белка не определялась. Поэтому в дальнейшем мы не сравнивали уровни САТ-активности в стабильно трансформированной культуре клеток и в вариантах наших опытов.

Интенсивность ацетилирования хлорамфеникола, по которой принято судить об уровне САТ-экспрессии, мы учитывали количественно, сканируя на денситометре плотность и размер пятен радиоавтографов. Такой количественный учет правомочен, поскольку при постановке реакции ацетилирования ^{14}C -хлорамфеникола в пробы вносили строго одинаковое количество белка. Основываясь на данных рис. 2, можно подсчитать, что на третий день после трансфекции культур клеток плазмидой *pSV2cat* уровень экспрессии САТ-гена примерно в 6,3 раза ($1,46 : 0,23 = 6,3$) выше в варианте совместного введения рекомбинантной плазмиды с вирусом SV40 (рис. 2, пик 2), чем при введении одной лишь плазмиды (рис. 2, пик 3).

Таким образом, на модельном САТ-гене нам удалось показать, что использование условий одновременного введения обезьяньего вакуолизирующего вируса 40 и рекомбинантных плазмидных ДНК с эукариотическим регуляторным районом дает возможность усилить экспрессию генов, находящихся под промотором SV40.

Резюме. За одночасного введення до культури клітин савців мав'пячого вакуолізуючого вірусу 40 і рекомбіантних плазмід з регуляторним районом SV40 показано посилення експресії модельного гена хлорамфенікол-ацетилтрансферази, що знаходиться у складі рекомбіантного вектора під промотором SV40.

Summary. The expression of the CAT-gene included in the recombinant plasmid *pSV2cat* has been studied in the culture of simian CV1 cells. The increased level of CAT activity has been shown if recombinant vector contained SV40 regulatory region was introduced into mammalian cells simultaneously with SV40 virus.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ландау С. М., Сасина Л. К., Шлякєвич М. А., Дризе О. Б. Изучение репликации плазмид, содержащих полный геном SV40, в пермиссивных культурах клеток млекопитающих // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 2. — С. 94—97.
2. Ландау С. М., Тихонов А. В., Варжанава И. С., Жарова Л. Г. Определение репликативной активности рекомбинантных плазмид, содержащих эукариотический регуляторный район вируса SV40, в культурах клеток млекопитающих // Там же. — 1991. — 7, № 5. — С. 103—107.
3. Ландау С. М., Коломиец Л. И., Тихонов А. В. Подходы к изучению функциональной активности регуляторного района вируса SV40 в составе рекомбинантных плазмид // Цитология и генетика. — 1993. — 27, № 6.
4. Green O. B., Brooks T. L. Recently replicated Simian virus 40 DNA is preferential template for transcription and replication // J. Virol. — 1978. — 26. — P. 325—334.
5. Balchelor A. N., Hare P. O. Regulation and cell-type-specific activity of promoter located upstream of the latency-associated transcript of Herpes simplex virus type I // Ibid. — 1990. — 64, N 7. — P. 3269—3279.
6. Виханская Ф. Л., Поселова Т. В., Волков И. В. и др. Продукт гена *p53* вовлечен в регуляцию активности промотора протоонкогена *c-fos* / Докл. АН СССР. — 1991. — 321, № 4. — С. 846—849.
7. Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. — М.: Мир, 1988. — 413 с.
8. Филипович Ю. Б. Практикум по общей биохимии. — М., 1982. — 310 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 27.11.92