

Разработка репортерной системы для параллельного анализа активности транскрипционных факторов.

Научный руководитель – Брускин Сергей Александрович

Хан Алексей Владимирович

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра генетики, Москва, Россия

E-mail: khanav1996@mail.ru

Транскрипционные факторы являются специфическими ДНК-связывающими белками, контролирующими процессы транскрипции и играющими ключевую роль в развитии живых организмов. В настоящее время различные факторы транскрипции активно изучаются, поскольку участвуют в пролиферации клеток, регуляции клеточного цикла и сигнальных каскадах, вызванных стрессом. Существуют различные методы анализа с помощью генов люциферазы, β -глюкуронидазы и зеленого флуоресцирующего белка. Например, анализ с помощью репортерных конструкций позволяет исследовать их роль в различных сигнальных путях. Такой анализ позволяет выявлять изменения экспрессии генов, идентифицировать регуляторные циклы и может обладать высокой чувствительностью.

Тем не менее, многие системы анализа не позволяют проводить одновременную оценку активности нескольких факторов транскрипции. В данной работе мы разработали конструкцию для решения данной задачи: проведение параллельного анализа и осуществления нормализации данных. В нашей работе мы использовали лентивирусные конструкции для облегчения последующего применения репортера, которые получили широко распространение, благодаря большой емкости, возможности введения различных генных конструкций, а также способности инфицировать неделящиеся клетки [1].

Мы разработали дизайн репортера, позволяющий с минимальными затратами времени клонировать сайты связывания транскрипционных факторов. Данная конструкция состоит из сайта посадки транскрипционного фактора AP1, минимального промотора, константных регионов, разделенных химерным интроном и уникального молекулярного идентификатора. Благодаря наличию сайта связывания транскрипционного фактора, возможно изучение активности соответствующего фактора транскрипции. Репортерный ген GFP позволяет не только детектировать трансформацию в изучаемых клетках НЕК, но и изучать влияния экзогенных стимулов [2]. Последовательность мультирепортера встроили в вектор pLeGo_G2, подходящий при производстве лентивирусных частиц, предварительно исключив из него сайты рестрикции BbsI. Задача состоит в создании целого набора лентивирусных векторов, отличающихся между собой только сайтом связывания транскрипционного фактора и уникальным молекулярным идентификатором. После проведения трансформации изучаемых клеток, и выделения РНК, будет возможно одновременное детектирование различий в экспрессии, используя специфические зонды к уникальному молекулярному идентификатору методом ПЦР в реальном времени. С помощью данного универсального подхода возможно одновременное изучение нескольких транскрипционных факторов, участвующих в регуляции экспрессии генов.

Источники и литература

- 1) Verhoeven E. et al. Surface-engineering of lentiviral vectors // J Gene Med 2004, p. 83.
- 2) Tian J. et al. Lentiviral microarrays for real-time monitoring of gene expression dynamics // Lab Chip, 10. 2010, p. 1967.