

Использование системы Cre-LoxP для индукции множественных хромосомных перестроек в геноме клеток человека

Научный руководитель – Фишман Вениамин Семёнович

Мунгалов Роман Владимирович

Студент (бакалавр)

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

E-mail: mungalov.roman@yandex.ru

Одной из самых глобальных задач современной биологии является стремление узнать функциональную роль всех составляющих элементов человеческого генома. Существующих методов молекулярной и эволюционной биологии оказывается недостаточно для достижения такой цели [1]. В данной работе нами проведены первые шаги к созданию новой скрининговой системы для выявления функциональных элементов в геноме человека. Метод основан на введении в геном множественных LoxP-сайтов с последующей индукцией хромосомных перестроек при помощи Cre-LoxP системы [2, 3] и далее, за счёт искусственной селекции, обогащении геномов клеток функциональными элементами. Интеграция LoxP-сайтов в геном производилась с помощью лентивирусных векторов. Оценки эффективности встройки вируса в геном, проведенные с помощью количественной ПЦР, позволили оценить количество интеграций LoxP-сайта в среднем на клетку, что составило ~50 событий в масштабах всего генома. Мы также показали, что концентрирование вирусов позволяет значительно увеличить количество провирусных интеграций.

В качестве системы для направленной селекции клеток на уменьшение контента ДНК, мы использовали прижизненный краситель Vybrant DyeCycle, который позволяет окрашивать ДНК клеток и отсортировывать ту часть популяции, у которой геном был редуцирован. Однако тестовые эксперименты с красителем показали его способность детектировать лишь существенную разницу в количестве ДНК, соизмеримую с плоидностью клеток, но не хромосомные делеции. На данный момент ведётся разработка альтернативной системы селекции клеток на предмет их обогащения функциональными элементами посредством Cre-LoxP системы.

Источники и литература

- 1) Kellis, M. et al. Defining functional DNA elements in the human genome // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014, №111 (17). p. 6131-6138
- 2) Sauer, B., and N. Henderson. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1988, №85 (14). p. 5166–70
- 3) <https://www.addgene.org/cre-lox> (Некоммерческое хранилище плазмид Addgene.org)