

## СТАБИЛЬНАЯ ТРАНСФЕКЦИЯ НЕСКОЛЬКИХ ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРОВ ПОСРЕДСТВОМ ТРАНСПОЗОННОЙ СИСТЕМЫ «SLEEPING BEAUTY»

Д.С. Набережнов, канд. биол. наук

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российской академии наук (Россия, г. Москва)

DOI:10.24412/2500-1000-2022-11-1-25-28

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60031.*

**Аннотация.** Транспозонная система «Sleeping Beauty» широко используется в молекулярной биологии, как система невирусной доставки плазмидной ДНК для получения клеточных линий стабильно экспрессирующих белок гена интереса. Для различных приложений молекулярной биологии требуется экспрессия нескольких белков в одной клетке. Нами было продемонстрировано, что транспозонная система «Sleeping Beauty» может быть использована для получения стабильных клеточных линий, экспрессирующих несколько трансгенных белков.

**Ключевые слова:** экспрессия трансгенов, транспозонная система «Sleeping Beauty», множественная трансфекция, стабильная трансфекция клеток.

Транспозоны – это участки ДНК, которые обладают способностью перемещаться и реплицироваться внутри генома. Транспозоны были открыты в 1940-х годах Барбарой МакКлинток (нобелевской премия по медицине 1983 [1]) в геноме кукурузы, а позже были обнаружены практически во всех живых организмах, у человека примерно 50% генома происходят от транспозонов [2, 3]. Подавляющее большинство транспозонов находятся в неактивном состоянии поскольку накопили инактивирующие мутации в течение эволюционного процесса и стали так называемой «мусорной ДНК». Последние исследования показали, что такие неактивные генетические элементы, тем не менее, можно вернуть в активное состояние при помощи подходов обратной эволюции, заключающихся в устранение накопленных мутаций. Таким способом был восстановлен транспозон семейства Tc1, происходящий из генома рыб. Полученный транспозон был назван «Sleeping Beauty» [4]. «Sleeping Beauty» является первым геном функциональность, которого была восстановлена из неактивного генетического материала, для которого в природе не встречается активная версия. Позже была получена гиперактивная версия «Sleeping Beauty» названная

SB100X [5]. В последствие транспозонная система «Sleeping Beauty» нашла широкое применение в биотехнологии для создания трансгенных клеточных линий. Данная система представляет собой невирусную систему доставки ДНК в клетки, которую можно комбинировать с липофекцией или электропорацией. Транспозонная система «Sleeping Beauty» состоит из двух плазмид одна из которых содержит ген SB100X, а другая ген белка интереса, фланкированный инвертированными повторами, узнаваемыми SB100X. Для получения трансгенной клеточной линии обе плазмиды трансфецируются в требуемую клеточную линию в результате чего плазида с геном интереса встраивается в геном клетки [6]. Этим способом, с использованием транспозонной системы «Sleeping Beauty», были получены клеточные линии для высокопродуктивной экспрессии слитного белка TNFR:Fc, перепрограммирования плюропотентных клеток, создания сенсора витамина D и других целей [7-11].

Тем не менее во всех случаях система «Sleeping Beauty» применялась для включения в геном одного гена интереса. Нами было показано, что транспозонная система «Sleeping Beauty» может быть использована для множественной стабильной транс-

фекции клеток млекопитающих, для встраивания в геном нескольких генов белка интереса.

### МЕТОДЫ

**Плазмиды.** pSB-IR-CAG-BleoR-T2A-eGFP и pSB-IR-CAG-BleoR-T2A-mCherry были ранее получены в нашей лаборатории. pCMV(CAT)T7-SB100 была получена из лаборатории Ж. Извак (Addgene plasmid # 34879; <http://n2t.net/addgene:34879>; RRID:Addgene\_34879).

**Культивирование клеточных линий.** Клетки HEK293T культивировали в 24-луночных планшетах в среде DMEM (Панэко, Россия), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки крови (Панэко, Россия) в инкубаторе при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

**Трансфекция.** За 5 часов до трансфекции клеточную среду меняли. Клетки трансфицировали с использованием TurboFect (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Плазмиды были смешаны в отношении 1:1:6 соответственно pSB-IR-CAG-BleoR-T2A-eGFP : pSB-IR-CAG-BleoR-T2A-mCherry : pCMV(CAT)T7-SB100. Плаз-

мидную ДНК для трансфекции выделяли при помощи набора Наборы Plasmid Miniprep (Evoagen, Россия) получали, в соответствии с протоколом производителя. Через двое суток среду меняли и добавляли среду с антибиотиком зеосин для селекции в концентрации 100 мкг/мл.

**Проточная цитометрия.** Клетки отделяли от поверхности 24-луночного планшета при помощи раствора 0,25% трипсина (Панэко, Россия) и раствора Версена (Панэко, Россия), промывали и ресуспендировали в растворе Дюльбекко (Панэко, Россия). Образцы анализировали с использованием проточного цитометра FACSCalibur (BD, США), используя канал FL1 и FL2. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Flowing Software 2. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для множественной стабильной трансфекции нами было использовано две плазмиды с генами флуоресцентных белков eGFP и mCherry и геном устойчивости к антибиотику Zeocin (рис. 1).

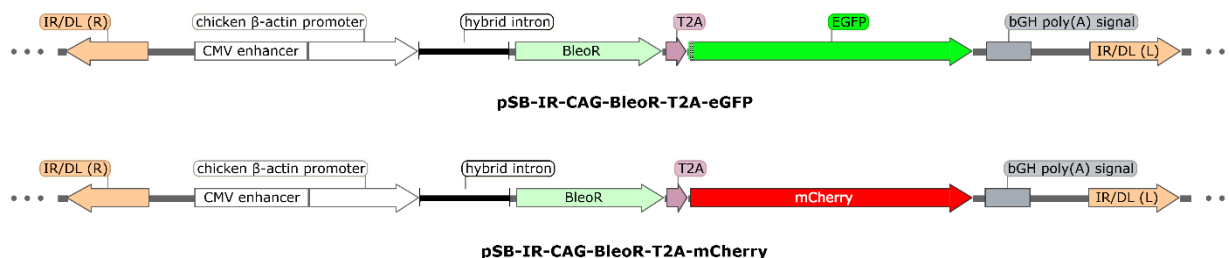


Рис. 1. Генетические карты плазмид, используемых для стабильной трансфекции

Флуоресцентные белки позволяют легко идентифицировать клетки со стабильной трансформацией, а ген устойчивости к антибиотику позволяет провести селекцию клеток, в которых произошла стабильная интеграция. Плазмида, содержащая белок eGFP (pSB-IR-CAG-BleoR-T2A-eGFP) и плазмида, содержащая белок mCherry (pSB-IR-CAG-BleoR-T2A-mCherry) были трансфицированы в клетки HEK293T вме-

сте с плазмидой, содержащей транспозон (pCMV(CAT)T7-SB100), после чего клетки, селектировались на стабильную трансформацию антибиотиком Zeocin. В качестве контроля использовалась смесь плазмид без SB100X. Полученные клеточные линии анализировались при помощи проточной цитометрии, результаты которой представлены на рисунке 2.

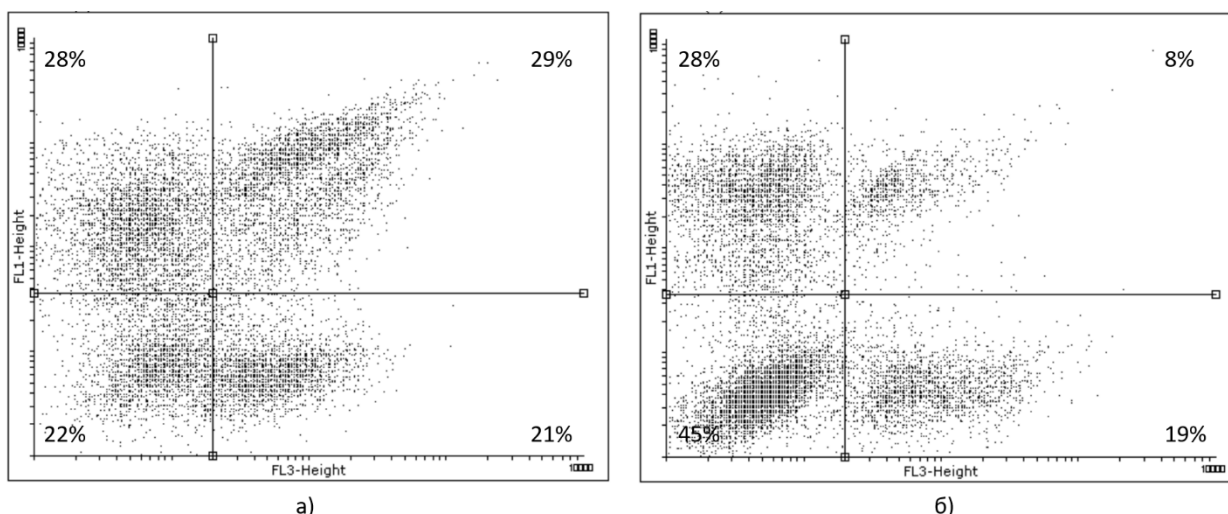


Рис. 2. Дот-плот распределения клеток по уровню флуоресценции зеленого цвета (FL1) и красного цвета (FL3), а) популяция клеток с использованием SB100X, б) популяция клеток без использования SB100X

Из рисунка видно, что в случае использования SB100X 29% всей популяции клеток флуоресцировали и зеленым и красным цветом, 50% популяции клеток – флуоресцировали только одним цветом и 22% не флуоресцировали. Если же SB100X не использовалась, то только около 8% популяции клеток флуоресцировали обоими цветами, 47% клеток флуоресцировали одним цветом и 45% не флуоресцировали. Отсутствие флуоресценции в части популяции клеток, по-видимому, связано с тем, что уровень флуоресценции в данных клетках низкий и не может быть детектирован при помощи проточной цитометрии, либо экспрессия флуоресцентных белков прекратилась из-за эпигенетического сайленсинга. Флуоресценция клеток обоими цветами свидетельствует о том, что в геном данных клеток интегрировались обе

плазмиды. Поэтому в случае использования SB100X 29% клеток подвергается множественной стабильной трансфекции, в то время как без использования SB100X только 8% клеток подвергается множественной стабильной трансфекции. Эти данные позволяют утверждать, что трансфекция с использованием SB100X позволяет получать стабильные клеточные линии содержащие вставки в геном из нескольких источников.

Таким образом, транспозон SB100X значительно увеличивает одновременную интеграцию обоих плазмид в геном, поэтому транспозонная система «Sleeping Beauty» может быть использована для тех случаев, когда требуется получение клеточной содержащей несколько трансгенных белков.

#### Библиографический список

1. Nobel Prize to Barbara McClintock: 5935 // Nature. Nature Publishing Group. 1983. Vol. 305, № 5935. P. 575-575.
2. Cordaux R., Batzer M.A. The impact of retrotransposons on human genome evolution: 10 // Nat Rev Genet. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 10, № 10. P. 691-703.
3. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. – [Electronic resource]. URL: <https://www.nature.com/articles/35057062> (accessed: 23.11.2022).
4. Ivics Z. et al. Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells // Cell. 1997. Vol. 91, № 4. P. 501-510.
5. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates // Nature Genetics. – [Electronic resource]. URL: <https://www.nature.com/articles/ng.343> (accessed: 23.11.2022).
6. Kowarz E., Löscher D., Marschalek R. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly

generate stable transgenic cell lines // *Biotechnol J.* 2015. Vol. 10, № 4. P. 647-653.

7. Staunstrup N.H. et al. A Sleeping Beauty DNA transposon-based genetic sensor for functional screening of vitamin D3 analogues // *BMC Biotechnol.* 2011. Vol. 11. P. 33.

8. Grabundzija I. et al. Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № 3. P. 1829-1847.

9. Petrakis S. et al. Gateway-compatible transposon vector to genetically modify human embryonic kidney and adipose-derived stromal cells // *Biotechnol J.* 2012. Vol. 7, № 7. P. 891-897.

10. Grabundzija I. et al. Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № 3. P. 1829-1847.

11. Balasubramanian S. et al. Comparison of three transposons for the generation of highly productive recombinant CHO cell pools and cell lines // *Biotechnol Bioeng.* 2016. Vol. 113, № 6. P. 1234-1243.

## **MULTIPLE TRANSFECTION OF PLASMID VECTORS BY THE SLEEPING BEAUTY TRANSPOSON SYSTEM**

**D.S. Naberezhnov**, *Candidate of Biological Sciences*

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences**

**(Russia, Moscow)**

**Abstract.** *The Sleeping Beauty transposon system is used in molecular biology as a non-viral plasmid DNA delivery system to stably expressing the gene of interest in cell lines. Expression of several proteins in a single cell is require for various applications of molecular biology. We have demonstrated that the Sleeping Beauty transposon system can be used to obtain stable cell lines expressing several transgenic proteins.*

**Keywords:** *transgene expression, the Sleeping Beauty transposon system, cotransfection, stable cell transfection.*