

УДК 577.2

**ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ РАКА
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СТАБИЛЬНО
ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ДОКСИЦИКЛИН-ЗАВИСИМУЮ
ЭНДОНУКЛЕАЗУ Cas9**

*А.К. Нургалиева, В.С. Скрипова, Л.Ф. Минигулова, Р.Г. Киямова
Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*

Аннотация

Рак поджелудочной железы (РПЖ) является одним из наиболее тяжелых и агрессивных онкологических заболеваний. РПЖ характеризуется невысокой выживаемостью и отсутствием методов ранней диагностики. На сегодняшний день химиотерапия и другие методы лечения РПЖ являются малоэффективными из-за высокой степени резистентности опухолей. Для повышения эффективности терапии РПЖ важно понимание механизмов, отвечающих за развитие устойчивости опухолевых клеток к применяемым препаратам, и выявление новых генов, ответственных за чувствительность к противоопухолевой терапии. Одним из инструментов, позволяющих идентифицировать гены, продукты которых могут регулировать чувствительность к химиотерапевтическим препаратам, является технология CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), которая подразумевает использование эндонуклеазы Cas9 для внесения двухцепочечных разрывов в последовательность изучаемых генов.

Целью работы является получение клеточной линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2, экспрессирующей доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9. Для этого с помощью упаковочных плазмид и плазмиды, содержащей ген эндонуклеазы Cas9, были получены лентивирусные частицы, содержащие ген эндонуклеазы Cas9. Полученными лентивирусными частицами была проведена трансдукция клеточной линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2 для получения моноклонов, стабильно экспрессирующих эндонуклеазу Cas9. Для проверки наличия экспрессии эндонуклеазы Cas9 в моноклональных клеточных линиях MIA-PaCa-2/Cas9 применяли вестерн-блот-анализ антителами против FLAG эпитопа.

В результате проведенной работы были получены две моноклональные клеточные линии РПЖ, стабильно экспрессирующие эндонуклеазу Cas9 (MIA PaCa-2/Cas9-D8 и MIA PaCa-2/Cas9-G10), которые могут быть использованы для поиска генов, вовлеченных в регуляцию чувствительности к химиотерапевтическим препаратам.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, CRISPR/Cas9, эндонуклеаза Cas9, MIA PaCa-2

Введение

Рак поджелудочной железы является одним из самых разрушительных и смертельных среди всех видов рака, пятилетняя выживаемость при РПЖ составляет всего 8% [1]. РПЖ характеризуется локальной инвазией, отдаленным метастазированием и высокой степенью химиорезистентности [2]. Низкий уровень

выживаемости при РПЖ обусловлен затрудненностью ранней диагностики из-за отсутствия симптомов, а также отсутствием эффективных схем лечения [3]. Стандартным лечением метастатического РПЖ является монотерапия гемцитабином, а также его комбинации с платиновыми препаратами. Было показано, что комбинированная терапия препаратами платины и капецитабина не улучшает результаты лечения РПЖ [4]. На сегодняшний день до конца не выявлены механизмы множественной резистентности РПЖ к химиотерапевтическим препаратам, поэтому идентификация генов, продукты которых вовлечены в эти механизмы, является актуальной задачей. Для поиска таких генов используют различные подходы, в том числе технологию редактирования генома CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas9 представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс, состоящий из одного эффекторного белка Cas9 и комплекса CRISPR-ПНК [5]. В природе эта система отвечает за возникновение адаптивного иммунитета у бактерий и архей при проникновении бактериофагов [6]. Технология CRISPR/Cas9 в настоящее время является одним из самых важных и перспективных открытий в молекулярной биологии.

Одно из применений системы CRISPR/Cas9 в области молекулярной онкологии – это поиск генов резистентности к химиотерапевтическим препаратам [7]. С помощью данной технологии можно получать нокауты определенных генов и тем самым определять их роль в развитии устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. В случае если нокаут определенного гена способствует увеличению чувствительности или развитию резистентности опухолевых клеток к тестируемому препарату, то следующим шагом может быть поиск и разработка таргетных препаратов, которые бы регулировали экспрессию генов или работу продукта данного гена в нужную сторону [8]. Одним из этапов использования технологии CRISPR/Cas9 является получение клеточных линий, которые бы экспрессировали эндонуклеазу Cas9.

Целью настоящей работы является получение клеточной линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2, экспрессирующей доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9.

1. Материалы и методы

1.1. Культивирование клеток млекопитающих. Для работы были использованы клеточные линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2 и почек эмбриона человека HEK 293T, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC, США). Клетки культивировали в среде DMEM (#C450п; Панэко, Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки, 4 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, при 37 °C в атмосфере с 5% CO₂.

1.2. Трансформация. Для амплификации рекомбинантной плазмиды pCW-Cas9 [9] (Addgene # 50661), несущей ген эндонуклеазы Cas9, слитый с FLAG-эпитопом, и упаковочных плазмид pMD2.G и psPAX-2 (D.Trono; Addgene #12259, #12260), которые содержат гены белкового капсида лентивирусов, использовали *E. Coli* штамма NovaBlue (#69825 Novagen, США). Трансформацию бактериальных клеток проводили с помощью теплового шока по стандартному

протоколу. Амплифицированные плазмиды выделяли с помощью коммерческого набора (Евроген, Россия).

1.3. Трансфекция. Для трансфекции использовали клетки линии НЕК 293Т. Клетки рассеивали в количестве 600 тыс. на лунку 12-луночного планшета. На следующий день к клеткам добавляли подготовленную смесь плазмид (pCW-Cas9 – 0.6 мкг, psPAX-2 – 0.425 мкг, pMD 2.g – 0.25 мкг) с 3.83 мкл трансфицирующего агента TransIT-Lenti (#MIR 6603; Mirus Bio, США) в среде OPTI-MEM (#31985062; Thermo Fisher Scientific, США). Через 48 ч собирали культуральную среду, центрифугировали 5 мин при 2000 g и отбирали супернатант с лентивирусными частицами.

1.4. Трансдукция. Клетки MIA PaCa-2 рассеивали в количестве 100 тыс. на лунку 12-луночного планшета. На следующий день заменяли среду на DMEM без сыворотки и антибиотиков, содержащую L-глутамин, 5 мкг/мл полибрена (#107689; Sigma-Aldrich, Германия) и добавляли 70–200 мкл среды с лентивирусными частицами. Клетки инкубировали 48 ч. Селекцию инфицированных клеток проводили в среде DMEM с 2 мкг/мл пурамицина (#sc-205821; Santa Cruz Biotechnology, США). В селективных условиях резистентные клетки, в отличие от клеток, не обладающих устойчивостью к антибиотикам, получают преимущество в размножении, что приводит к получению поликлональной популяции клеток, трансдуцированных вирусными частицами, несущими необходимый ген. Селекцию считали законченной, когда контрольные неинфицированные клетки полностью умирали в среде с селективным антибиотиком. Селектированные клетки MIA PaCa-2/Cas9 поддерживали в среде DMEM с 1 мкг/мл пурамицина.

1.5. Клональная селекция. Получение индивидуальных клонов клеток линии MIA PaCa-2 проводили с помощью метода последовательных разведений согласно протоколу Corning Inc (Corning Incorporated / Life Sciences, США) [10].

1.6. Индукция экспрессии Cas9 и получение растворимых белковых фракций лизатов клеток MIA PaCa-2/Cas9. Клетки MIA PaCa-2/Cas9 рассеивали в количестве 50 тыс. на лунку 6-луночного планшета. На следующий день в среду добавляли доксициклин (#D9891; Sigma-Aldrich, Германия) до конечной концентрации 1 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 6 сут. После инкубации с доксициклином клетки помещали на лед, промывали холодным фосфатно-солевым буфером (#P071; 10 mM Na₃PO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.76 mM K₃PO₄ pH 7.4; Панэко, Россия) и лизировали 30 мин в лизирующем буфере (#89900; 25 mM Трис-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 0.1% додецилсульфат натрия; Thermo Fisher Scientific, США) с 1-кратным коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз (#78430; Thermo Fisher Scientific, США). Лизированные клетки собирали при помощи скребков в заранее охлажденные пробирки. Полученные лизаты центрифугировали 30 мин при +4 °C, 21000 g. Растворимую белковую фракцию отбирали в чистые пробирки, хранили при –70 °C. Концентрацию белка в растворимых белковых фракциях лизатов

измеряли методом ВСА (бицинхолиновая кислота) с помощью коммерческого набора по инструкции производителя (#23225; Thermo Fisher Scientific, США).

1.8 Вестерн-блот-анализ. Растворимые белковые фракции лизатов наносили в количестве 20 мкг на лунку 10%-ного разделяющего полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфат натрия и проводили электрофорез 70 мин при напряжении 120 В. Разделенные белки переносили с геля на 0.45 мкм PVDF мембрану (#IPVH00010; Millipore, США) методом полусухого переноса с помощью прибора TransBlot Turbo (Bio-Rad, США). Мембрану с белками блокировали 1 ч в 5%-ном растворе обезжиренного молока (#A0830 AppliChem, США) на трис-солевом буфере с твином (ТСБ-Т; 20 mM трис pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Твин-20) при комнатной температуре. Заблокированную мембрану инкубировали ночь при +4 °C с первичными мышиными антителами против FLAG эпитопа (#MA1-91878; Thermo Fisher Scientific, США) для детекции белка Cas9 в разведении 1:500. В качестве контроля загрузки белка использовали антитела против GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) (#MA5-15738; Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:5 000. Мембраны отмывали в ТСБ-Т буфере от излишка первичных антител и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами козы против мышиных антител, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:5 000 (#31430; Thermo Fisher Scientific, США). Мембраны отмывали от избытка вторичных антител в ТСБ-Т буфере и инкубировали 5 мин при комнатной температуре с субстратом для пероксидазы хрена Clarity ECL (#1705060; Bio-Rad, США). Сигнал хемилюминисценции детектировали с помощью прибора ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

2. Результаты и их обсуждение

Для получения клеточной линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2, экспрессирующей рекомбинантную доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9, прежде всего необходимо было создать лентивирусные частицы, несущие ген Cas9, с помощью так называемых упаковочных плазмид psPAX2 и pMD2 и промежуточной клеточной линии HEK 293T. Схема работы представлена на рис. 1.

Плазмиды pCW-Cas9, psPAX2 и pMD2.G были амплифицированы в клетках *E. Coli* штамма *NovaBlue*, выделены и очищены в достаточных для трансфекции концентрациях (pCW-Cas9 – 449 нг/мкл, psPAX-2 – 281 нг/мкл, pMD 2.g – 785 нг/мкл). Сборку лентивирусных частиц осуществляли в клетках линии HEK 293T методом трансфекции с помощью трансфицирующего агента TransIT-Lenti (Mirus Bio, США). Сбор среды с лентивирусными частицами осуществляли через 48 ч. Лентивирусные стоки использовали для трансдукции клеток линии MIA PaCa-2 в количестве 70, 100, 150 и 200 мкл. В результате селекции на пуромицине были отобраны инфицированные клетки MIA PaCa-2, которые использовали для дальнейшей работы. Оптимальный объем вирус содержащей среды составил 150 мкл.

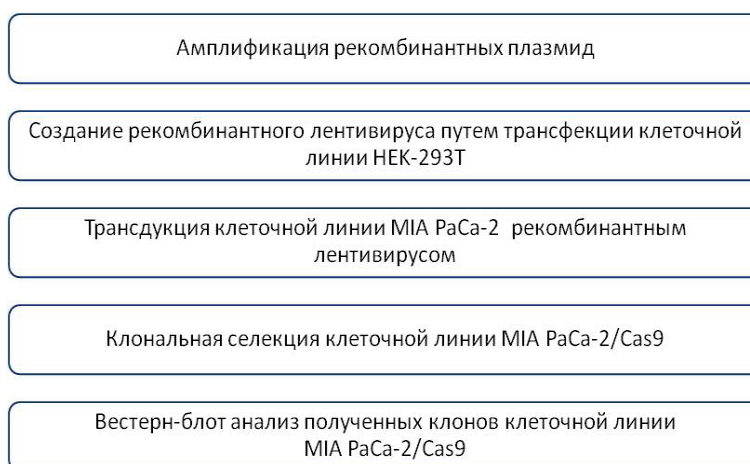


Рис. 1. Схема работы по получению клеточной линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2/Cas9

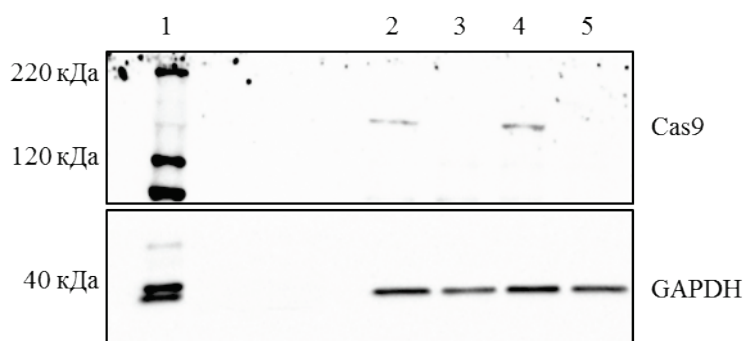


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ растворимых белковых фракций лизатов клеточной линии MIA PaCa-2/Cas9: 1 – маркер молекулярных масс MagicMark XP Western Protein Standard (LC5602; Invitrogen, США); 2, 4 – индукция доксициклином 1 мкг/мл; 3, 5 – неиндуцированный контроль

Для анализа экспрессии рекомбинантной Cas9 проводили индукцию ее экспрессии в присутствии доксициклина в концентрации 1 мкг/мл в течение 6 сут. Экспрессию Cas9 проверяли с помощью вестерн-блот-анализа антителами против FLAG эпитопа (рис. 2).

Для дальнейшей работы необходимо было получить моноклональную клеточную линию MIA PaCa-2/Cas9. Такой подход позволяет нивелировать возможную разницу в уровне экспрессии Cas9 у разных клонов в смешанной популяции клеток линии MIA PaCa-2/Cas9.

Для отбора индивидуальных клонов была проведена клональная селекция клеточной линии MIA PaCa-2/Cas9 методом последовательных разведений согласно протоколу Corning Inc. После разведения клеток на 96-луночном планшете было обнаружено 8 единичных клонов, из которых 5 клонов (B7, B8, C7, D8, G10) удалось нарастить для дальнейшего анализа.

Среди полученных индивидуальных клонов необходимо было выявить клон с максимальным уровнем экспрессии Cas9. Для этого была проведена индукция

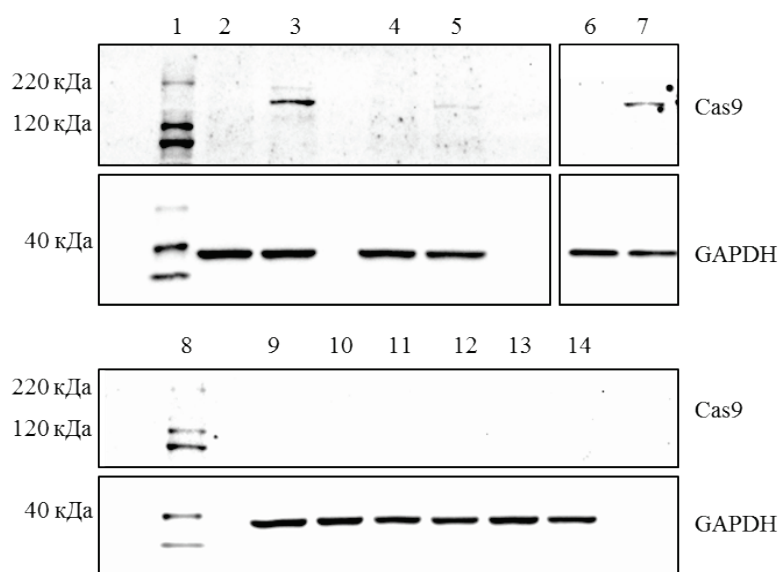


Рис. 3. Вестерн-блот-анализ растворимых белковых фракций лизатов индивидуальных клонов линии MIA PaCa-2/Cas9: 1, 8 – маркер молекулярных масс MagicMark XP Western Protein Standard (LC5602; Invitrogen, США); Растворимые белковые фракции лизатов: 2 – клон D8 «-» доксициклин; 3 – клон D8 «+» доксициклин; 4 – клон G10 «-» доксициклин; 5 – клон G10 «+» доксициклин; 6 – общая популяция клеток линии MIA PaCa-2/Cas9 «-» доксициклин; 7 – общая популяция клеток линии MIA PaCa-2/Cas9 «+» доксициклин; 9 – клон B7 «-» доксициклин; 10 – клон B7 «+» доксициклина; 11 – клон B8 «-» доксициклин; 12 – клон B8 «+» доксициклин; 13 – клон C7 «-» доксициклин; 14 – клон C7 «+» доксициклин

экспрессии Cas9 доксициклином 1 мкг/мл в течение 6 сут. Затем клетки собирали, получали растворимые белковые фракции лизатов и анализировали их с помощью вестерн-блот-анализа с использованием первичных мышинных антител против FLAG эпитопа для детекции Cas9. В качестве контроля нанесения использовали мышинные антитела против GAPDH. В качестве вторичных антител использовали мышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Результат проведенного вестерн-блот-анализа показал наличие доксициклин-зависимой экспрессии рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 у двух клонов D8 и G10 (рис. 3).

Таким образом, в результате проведенной работы мы выбрали оптимальные условия для трансдукции клеточной линии MIA PaCa-2 и получили две моноклональные клеточные линии MIA PaCa-2/Cas9-D8 и MIA PaCa-2/Cas9-G10, экспрессирующие рекомбинантную доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9.

Заключение

В настоящей работе с использованием лентивирусной технологии нами была получена клеточная линия рака поджелудочной железы MIA PaCa-2, стабильно экспрессирующая доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9. Эта клеточная линия может быть использована для создания нокаутных клеточных линий с применением технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. В будущем мы планируем использовать нокаутные клеточные линии для выявления

генов, вовлеченных в регуляцию чувствительности опухолевых клеток к рутинно применяемым химиотерапевтическим средствам. Выявленные гены могут служить мишенями для разработки новых таргетных препаратов и оптимизации уже существующих терапевтических схем лечения рака поджелудочной железы.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-15-20032), а также за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Литература

1. *Baines A.T., Martin P.M., Rorie C.J.* Current and emerging targeting strategies for treatment of pancreatic cancer // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2016. – V. 144. – P. 277–320. – doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.006.
2. *Liu H., Li L., Chen H., Kong R., Pan S., Hu J., Wang Y., Li Y., Sun B.* Silencing IGFBP-2 decreases pancreatic cancer metastasis and enhances chemotherapeutic sensitivity // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8, No 37. – P. 61674–61686. – doi: 10.18632/oncotarget.18669.
3. *Li J., Wientjes M.G., Au J.L.* Pancreatic cancer: Pathobiology, treatment options, and drug delivery // *AAPS J.* – 2010. – V. 12, No 2. – P. 223–232. – doi: 10.1208/s12248-010-9181-5.
4. *Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Баттулин Н.Р.* Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии // *Вавил. журн. генетики и селекции.* – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 493–510. – doi: 10.18699/VJ16.175.
5. *Bi H., Yang B.* Gene editing with TALEN and CRISPR/Cas in rice // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2017. – V. 149. – P. 81–98. – doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.006.
6. *Гробер Н.А., Сухан Т.О., Кузнецова Е.И.* CRISPR/CAS9 – Система редактирования генома с использованием технологии нуклеофекции // *Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы IX Междунар. конгресса.* – 2017. – Т. 1. – С. 265–266.
7. *Skripova V., Serebriiskii I., Abramova Z., Astsaturov I., Kiyamova R.* CRISPR/Cas9 technique for identification of genes regulating oxaliplatin resistance of pancreatic cancer cell line // *BioNanoScience.* – 2016. – V. 7, No 1. – P. 97–100. – doi: 10.1007/s12668-016-0272-3.
8. *Gaponova A.V., Deneka A.Y., Beck T.N., Liu H., Andrianov G., Nikonova A.S., Golemis E.A., Serebriiskii I.G.* Identification of evolutionarily conserved DNA damage response genes that alter sensitivity to cisplatin // *Oncotarget* – 2017. – V. 8, No 12. – P. 19156–19171. – doi: 10.18632/oncotarget.13353.
9. *Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M., Lander E.S.* Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system // *Science.* – 2014. – V. 343. – P. 80–84. – doi: 10.1126/science.1246981.
10. *Ryan J.A.* Cell Cloning by Serial Dilution 96 Well Plates: Protocol // *Life Sciences.* – 2008. – URL: https://www.corning.com/catalog/cls/documents/protocols/Single_cell_cloning_protocol.pdf.

Поступила в редакцию
29.11.17

Нургалиева Алсина Камиловна, студент кафедры биохимии и биотехнологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: alsina97@mail.ru

Скрипова Вера Сергеевна, аспирант кафедры биохимии и биотехнологии, младший научный сотрудник НОЦ «Биомедицинские технологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: vsk190@gmail.com

Минигулова Лейсан Фаритовна, аспирант кафедры биохимии и биотехнологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: minigulovalf@gmail.com

Киямова Рамзия Галлямовна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии, старший научный сотрудник НОЦ «Биомедицинские технологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: kiyamova@mail.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2018, vol. 160, no. 3, pp. 386–394

Obtaining a Pancreatic Cancer Cell Line Stably Expressing Doxycycline-Dependent Endonuclease Cas9

A.K. Nurgalieva^{}, V.S. Skripova^{**}, L.F. Minigulova^{***}, R.G. Kiyamova^{****}*

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}alsina97@mail.ru, ^{**}vsk190@gmail.com, ^{***}minigulovalf@gmail.com,
^{****}kiyamova@mail.ru

Received November 29, 2017

Abstract

Pancreatic cancer is one of the most painful and aggressive types of cancer with high lethality rate. Early diagnosis of the disease is limited and antitumor therapy has low efficacy, because pancreatic cancer shows multiple drug resistance. It is still unclear how pancreatic tumor cells become resistant to chemotherapy and understanding of the resistance mechanisms and identification of their regulating genes is necessary to develop a new and more efficient pancreatic cancer therapy. One of the methods to identify such genes is CRISPR/Cas9 technology (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) where Cas9 endonuclease is used to make double-strand DNA breaks in target genes.

The aim of this work is modification of the pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 to express a doxycycline-inducible Cas9 endonuclease gene. Several plasmid vectors have been used to create a lentivirus containing the Cas9 endonuclease gene. The virus has been used for transduction of tumor cells to get doxycycline-inducible Cas9 expressing clones. Cas9 endonuclease expression has been detected by the western blot analysis with antibodies to FLAG epitope.

Two tumor clones of the MIA Pa-Ca2/Cas9 cell line expressing Cas9 endonuclease have been generated. These cells can be used further to search genes related to regulation of the susceptibility to antitumor drugs.

Keywords: pancreatic cancer, CRISPR/Cas9, Cas9 endonuclease, MIA PaCA-2

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 15-15-20032) and performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University.

Figure Captions

- Fig. 1. The scheme of work on obtaining the pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 / Cas9.
- Fig. 2. The western blot analysis of the soluble protein fractions of lysates from the MIA PaCa-2/Cas9 cell line: 1 – MagicMark XP Western Protein Standard (LC5602; Invitrogen, USA); 2, 4 – induction with doxycycline 1 mkg/ml; 3, 5 – non-induced control.
- Fig. 3. The western blot analysis of the soluble protein fractions of lysates from the individual clones of the MIA PaCa-2/Cas9 cell line: 1, 8 – MagicMark XP Western Protein Standard (LC5602; Invitrogen, USA); soluble cell lysates: 2 – clone D8 “–” doxycycline; 3 – Clone D8 “+” doxycycline; 4 – clone G10 “–” doxycycline; 5 – clone G10 “+” doxycycline; 6 – general cell population of MIA PaCa-2/Cas9 “–” doxycycline; 7 – general cell population of MIA PaCa-2 / Cas9 “+” doxycycline; 9 – clone B7 “–” doxycycline; 10 – clone B7 “+” doxycycline; 11 – clone B8 “–” doxycycline; 12 – clone B8 “+” doxycycline; 13 – clone C7 “–” doxycycline; 14 – clone C7 “+” doxycycline.

References

1. Baines A.T., Martin P.M., Rorie C.J. Current and emerging targeting strategies for treatment of pancreatic cancer. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2016, vol. 144, pp. 277–320. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.006.
2. Liu H., Li L., Chen H., Kong R., Pan S., Hu J., Wang Y., Li Y., Sun B. Silencing IGFBP-2 decreases pancreatic cancer metastasis and enhances chemotherapeutic sensitivity. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 37, pp. 61674–61686. doi: 10.18632/oncotarget.18669.
3. Li J., Wientjes M.G., Au J.L. Pancreatic cancer: Pathobiology, treatment options, and drug delivery. *AAPS J.*, 2010, vol. 12, no. 2, pp. 223–232. doi: 10.1208/s12248-010-9181-5.
4. Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanchikova V.A., Battulin N.R. CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 440–458. doi: 10.1134/S2079059717040116.
5. Bi H., Yang B. Gene editing with TALEN and CRISPR/Cas in rice. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2017, vol. 149, pp. 81–98. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.006.
6. Grober N.A., Sukhan T.O., Kuznetsova E.I. CRISPR/CAS9 – a system of genome editing using nucleofection technology. *Biotekhnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya: Materialy IX Mezhdunar. kongressa* [Biotechnology: State and Prospects of Development: Proc. IX Int. Conf.], 2017, vol. 1, pp. 265–266. (In Russian)
7. Skripova V., Serebriiskii I., Abramova Z., Astsaturov I., Kiyamova R. CRISPR/Cas9 technique for identification of genes regulating oxaliplatin resistance of pancreatic cancer cell line. *BioNanoScience*, 2016, vol. 7, no. 1, pp. 97–100. doi: 10.1007/s12668-016-0272-3.
8. Gaponova A.V., Deneka A.Y., Beck T.N., Liu H., Andrianov G., Nikonova A.S., Golemis E.A., Serebriiskii I.G. Identification of evolutionarily conserved DNA damage response genes that alter sensitivity to cisplatin. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 12, pp. 19156–19171. doi: 10.18632/oncotarget.13353.
9. Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M., Lander E.S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, vol. 343, pp. 80–84. doi: 10.1126/science.1246981.
10. Ryan J.A. Cell Cloning by Serial Dilution 96 Well Plates Protocol. *Life Sciences*, 2008. Available at: http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/Single_cell_cloning_protocol.pdf.

Для цитирования: Нурғалиева А.К., Скрипова В.С., Минигулова Л.Ф., Киямова Р.Г. Получение клеточной линии рака поджелудочной железы, стабильно экспрессирующей доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9 // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2018. – Т. 160, кн. 3. – С. 386–394.

For citation: Nurgalieva A.K., Skripova V.S., Minigulova L.F., Kiyamova R.G. Obtaining a pancreatic cancer cell line stably expressing doxycycline-dependent endonuclease Cas9. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2018, vol. 160, no. 3, pp. 386–394. (In Russian)