

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра генетики

А.А. Шаймарданова, А.И. Муллагулова, А.А. Ризванов,
В.В. Соловьева

**ПРАКТИКУМ ПО РАЗРАБОТКЕ И АНАЛИЗУ ГЕНЕТИЧЕ-
СКИХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАН-
НОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ
НАКОПЛЕНИЯ**

Учебно-методическое пособие

Казань 2022

УДК 573.6
ББК 28.0
Ш17

*Печатается по рекомендации учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии КФУ
(протокол № 4 от 16 марта 2022 г.)*

Рецензенты:

доктор медицинских наук **Р.Р. Исламов**;
доктор медицинских наук **Я.О. Мухамедшина**

Шаймарданова А.А.

Практикум по разработке и анализу генетических векторов на основе аденоассоциированного вируса для лечения лизосомных болезней накопления: учебно-методическое пособие / А.А. Шаймарданова, А.И. Муллагулова, А.А. Ризванов, В.В. Соловьева. – Казань: Изд-во Казан. Ун-та, 2022. – 57 с.

В учебно-методическом пособии изложены методы создания и анализа генетических конструкций на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса. Методическое пособие составлено в соответствии с современной структурой изучения учебных медицинских дисциплин, является дополнением к теоретическим курсам и рекомендовано для изучения следующих дисциплин: Б1.В.02 «Методы исследования в биологии и медицине», Б1.В.ДВ.2 «Методы генетических исследований», Б1.В.ДВ.4 «Клиническая генетика», Б1.Б.48 «Медицинская генетика», Б1.Б.23 «Клеточная и молекулярная биология» и Б1.В.ДВ.2 «Методы клеточной и молекулярной биологии».

УДК 573.6
ББК 28.0

**© Шаймарданова А.А., Муллагулова А.И., Ризванов А.А.,
Соловьева В.В., 2022**

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА.....	8
1.1 СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРНЫХ ПЛАЗМИД	11
1.2 НАРАБОТКА (АМПЛИФИКАЦИЯ) ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРНЫХ ПЛАЗМИД	13
1.2.1 Культивирование клеток <i>E. coli</i>	13
1.2.2 Проведение генетической трансформации клеток <i>E. coli</i> .	13
1.2.3 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> с использованием $CaCl_2$ метода	14
1.2.4 Генетическая трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> (тепловой шок).....	16
1.2.5 Выделение плазмидной ДНК	16
1.3 РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК.....	18
1.4 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ	19
1.5 ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ.....	21
1.6 КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ААВ	23
1.7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА ААВ.....	29
ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ	30
2.1 ТРАНСФЕКЦИЯ.....	31
2.2 ТРАНСДУКЦИЯ.....	32
2.3 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК С ПОМОЩЬЮ TRI РЕАГЕНТА	34
2.4 СИНТЕЗ КДНК	35
2.5 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ.....	37
2.6 ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА И ВЕСТЕРН-БЛОТ АНАЛИЗ	41
2.6.1 Выделение белка.....	41
2.6.2 Нормализация по общей концентрации белка	42
2.6.3 Вестент-блот анализ.....	43
2.7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ARSA	50
2.8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НЕХА.....	52
ЛИТЕРАТУРА	55

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4MUGS	4-метилумбеллиферил-GlcNAc-6-сульфат (англ. 4-methylumbelliferyl-GlcNAc-6-sulfate)
ААВ	Аденоассоциированный вирус
БСА	Бычий сывороточный альбумин
БТС	Болезнь Тея-Сакса
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
кДа	Килодальтон
кДНК	Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛБН	Лизосомные болезни накопления
МЛД	Метахроматическая лейкодистрофия
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
МСК	Мезенхимная стволовая клетка
ПНС	Периферическая нервная система
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция в реальном времени
РНК	Рибонуклеиновая кислота
т.п.н.	Тысяча пар нуклеотидов
ТАЕ	Трис-ацетат-ЭДТА (англ. Tris-acetate-EDTA,)
ТЕМЕД	Тетраметилэтилендиамин
тРНК	Транспортная рибонуклеиновая кислота
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
ЦНС	Центральная нервная система
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
AAV293	Субпопуляция клеток НЕК293, предназначенная для сборки аденоассоциированных вирусов
APS	Персульфат аммония (англ. ammonium persulfate)
ARSA	Арилсульфатаза А (англ. arylsulfatase A)
CAI	Индекс адаптации кодонов (англ. Codon Adaptation Index)
dH ₂ O	Деионизированная вода
DMEM	Модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
GFP	Зеленый флуоресцентный белок (англ. Green Fluorescent Protein)
HBS	HEPES-буферный раствор (англ. HEPES Buffered Saline)
HEK293	Клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (англ. Human Embryonic Kidney 293)

HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HexA	β -гексозаминидаза А (англ. β -hexosaminidase A)
ITRs	Инвертированные концевые повторы (англ. inverted terminal repeats)
LS-LB	среда мало солевая Лурия-Бертани
MOI	множественность инфекции (англ. multiplicity of infection)
OD ₆₀₀	Оптическая плотность при 600 нм (англ. optical density)
PBST	Фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1 % Tween [®] 20 (англ. phosphate-buffered saline, 0,1 % Tween [®] 20 detergent)
PMSF	Фенилметилсульфонил фторид (англ. phenylmethane sulfonyl fluoride)
RIPA	Буфер для радиоиммунопреципитации (англ. radioimmunoprecipitation assay buffer)
RPE65	Фермент клеток сетчатки глаза, участвующий в регенерации светочувствительного пигмента
SapB	Сапозин В (англ. saposin B)
SDS	Додецилсульфат натрия (англ. sodium dodecyl sulfate)
SMN1	Фактор выживания мотонейрона 1 (англ. survival motor neuron)
TOP10	штамм <i>E. coli</i>
Tris-HCl	Буфер на основе трис(гидроксиметил)аминометана и соляной кислоты
p.NCS	p-нитрокатехол сульфат (англ. p-nitrocatechol sulfate)

ВВЕДЕНИЕ

Лизосомные болезни накопления (ЛБН) представляют собой группу из более чем 50 генетических нарушений, вызванных мутациями в генах ферментов, которые участвуют в клеточной деградации и переносе липидов и других макромолекул [1]. Накопление липидов и других макромолекул в лизосомах приводит к разрушению пораженных клеток. Хотя клинические проявления у разных ЛБН сильно разнятся, более чем у половины из них наблюдаются симптомы нейродегенерации [2].

В учебно-методическом пособии представлены методики получения и анализа генетических конструкций, применяемых для разработки генных препаратов на примере рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (ААВ), для лечения метахроматической лейкодистрофии (МЛД) и болезни Тея-Сакса (БТС).

БТС и МЛД являются аутосомно-рецессивными наследственными заболеваниями, относящимися к группе ЛБН и поражающих нервную систему. МЛД характеризуется поражением миелиновой оболочки, покрывающей большинство нервных волокон центральной и периферической нервной системы (ЦНС и ПНС, соответственно). Заболевание возникает вследствие дефицита лизосомного фермента арилсульфатазы А (англ. arylsulfatase A, ARSA) (OMIM 250100) или белка-активатора сапозина В (англ. saposin B, SapB) (OMIM 249900). БТС обусловлена дефицитом фермента β -гексозаминидазы А (англ. β -hexosaminidase A, HexA), в результате чего происходит накопление GM2-ганглиозидов в нервной и других тканях организма. Дефицит фермента возникает вследствие различных мутаций гена *HEXA* (OMIM 272800). Накопление GM2-ганглиозидов приводит к деструкции мембран нейронов.

Оба заболевания клинически проявляются прогрессирующей двигательной и когнитивной недостаточностью у пациентов. В настоящее время не существует способа лечения БТС и МЛД. Актуальной задачей является разработка эффективных и безопасных методов лечения. Описанные в настоящем пособии методы позволяют получить лабораторные образы генных препаратов, позволяющих доставить гены недостающих лизосомных ферментов в нервную систему и предотвратить их дефицит, что предположительно может привести к остановке нейродегенерации.

Итак, в настоящем учебно-методическом пособии описывается следующий алгоритм получения лабораторного образца генного препарата:

1. Создание экспрессионной векторной плазмиды, содержащей кодон-оптимизированную последовательность комплементарной ДНК (кДНК) гена мутантного фермента (например, ген *ARSA* для МЛД, гены α - и β -субъединиц НехА, *HEXA* и *HEXB*, соответственно, для БТС);

3. Нарботка и очистка рекомбинантного ААВ на основе полученной векторной плазмиды;

4. Анализ функциональности генетических конструкций в культуре клеток (с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), вестерн-блот анализа, теста на активность ферментов);

Данный алгоритм может быть использован для разработки генных препаратов для других моногенных заболеваний, в том числе ЛБН.

ГЛАВА 1. РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА

На сегодняшний день одной из самых безопасных и эффективных стратегий генной терапии является применение препаратов на основе рекомбинантных ААВ. Это связано, главным образом, с тем, что они не являются патогенными или иммуногенными для людей, показывают высокую эффективность трансдукции и обладают широким тропизмом к различным типам тканей [3, 4].

Применение ААВ особенно актуально для лечения моногенных наследственных заболеваний, то есть вызванных мутациями в одном гене. На сегодняшний день генные препараты на основе ААВ с успехом проходят доклинические и клинические испытания и на рынке появляются инновационные препараты для лечения различных заболеваний человека, в том числе тех, которые ранее считались неизлечимыми. Например, одним из новых прорывных генных препаратов считается «Золгенсма» (одобрен в 2019 году Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США), который предназначен для лечения спинальной мышечной атрофии, заболевания, которое характеризуется дегенерацией двигательных нейронов передних рогов спинного мозга и потерей их функций. Препарат представляет собой вектор на основе ААВ 9-го серотипа, кодирующий кДНК гена фактора выживания мотонейрона 1 (англ. survival motor neuron, SMN1). При внутривенном введении ААВ9 проникает через гематоэнцефалический барьер и обеспечивает целевую доставку гена *SMN1* в нейроны. Показано, что внутривенное введение препарата приводит к улучшению моторных навыков пациентов и снижению клинических проявлений заболевания [5].

Также зарегистрированным генным препаратом на основе ААВ является «Люкстурна» (одобрен в 2017 году Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) который предназначен для лечения дистрофии сетчатки, вызванной биаллельными мутациями гена *RPE65* (фермента клеток сетчатки глаза, участвующего в регенерации светочувствительного пигмента). Доставка генного препарата в клетки сетчатки приводит к возобновлению синтеза нормального белка RPE65, необходимого для регенерации светочувствительного пигмента [6].

Самым первым зарегистрированным в мире генным препаратом на основе ААВ, одобренным Европейской комиссией в 2012 году, является «Глибера» (Glybera), который предназначен для лечения редкого наследственного заболевания – дефицита липопротеинлипазы [7]. Таким образом, ААВ являются перспективным инструментом для доставки генов терапевтических белков при различных заболеваниях человека.

ААВ представляют собой небольшие (25 нм) безоболочечные вирусы, которые упаковывают линейную одноцепочечную ДНК примерно в 4,7 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.). Геном ААВ дикого типа включает два инвертированных концевых повтора (англ. *inverted terminal repeats, ITRs*) из 145 нуклеотидов, фланкирующих две открытые рамки считывания структурных (*cap*) и упаковывающих (*rep*) генов, необходимых для образования вирусных частиц. Гены *cap* кодируют белки вирусного капсида VP1, VP2 и VP3 и белок-активатор сборки, а гены *rep* необходимы для репликации вируса и упаковки вирусных геномов [4].

Сборка ААВ требует наличие белков вспомогательного вируса, поэтому необходимо совместное инфицирование с аденовирусом или вирусом герпеса. Современные методы позволяют получать векторы на основе ААВ без использования вспомогательного вируса. Например, система без помощников ААВ (AAV Helper-Free system, Agilent Technologies, США) подразумевают использование клеточных линий и плазмид, содержащих необходимые гены аденовируса. При этом большая часть генов аденовируса, необходимых для продуцирования инфекционных частиц ААВ, находятся на плазмиде pHelper (гены *e2a*, *e4* и *va*), а специальная клеточная линия AAV293 (производная клеточной линии HEK293) стабильно экспрессирует ген *e1*. Для создания векторной плазмиды из генома ААВ дикого типа вырезаются гены *rep* и *cap* и заменяются трансгеном с его регуляторными элементами, которые все вместе с двух сторон фланкированы ITRs (рисунок 1). А гены *rep* и *cap* содержит плазида pAAV-RC. Благодаря тому, что последовательности ITRs и генов *rep/cap* находятся на отдельных плаزمиде, продукция рекомбинантного вируса дикого типа предотвращается. Это обеспечивает биобезопасность подхода.

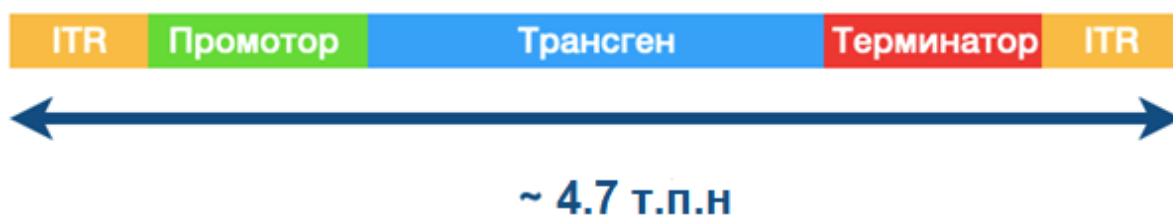


Рис. 1. Схематическое изображение основных компонентов генной вставки векторной плазмиды. ITR – инвертированный концевой повтор

Таким образом, система для сборки ААВ без вируса-помощника содержит следующие компоненты:

- 1) рAAV-MCS – плазида, содержащая трансген и его регуляторные элементы, фланкированные ITRs;
- 2) рAAV-RC – плазида, содержащая *rep* и *cap*;
- 3) рHelper – плазида, содержащая необходимые гены аденовируса;
- 4) Клеточная линия AAV293, стабильно экспрессирующая необходимый ген аденовируса.

На сегодняшний день известно множество различных серотипов ААВ, среди которых есть как природные, так и гибридные. Подробное изучение и модификация капсидов ААВ позволили повысить эффективность нацеливания на определенные типы клеток для достижения их селективного заражения. В таблице 1 приведена информация по тканевому тропизму некоторых серотипов ААВ [8]. Изменение серотипа векторов на основе ААВ достигается путем изменения нуклеотидной последовательности *cap*. Например, в компании Addgene на сегодняшний день доступны 5 плазмид для сборки различных серотипов ААВ: рAAV2/1, рAAV2/7, рAAV2/8, рAAV2/9n, рAAV2/rh10, подходящих для сборки 1, 7, 8, 9 и 10 серотипов, соответственно.

Итак, ААВ способны трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, не интегрируются в геном клетки, способны длительно сверхэкспрессировать трансген, имеют низкие уровни иммуногенности и цитотоксичности, имеют множество серотипов, которые показывают тропизм к различным типам тканей. Эти характеристики делают их привлекательным инструментом для генной терапии различных заболеваний. Основным ограничением является маленький размер вставки, поскольку геном ААВ составляет всего около 4.7 т.п.н. [9].

Таблица 1

Тканевый тропизм различных серотипов ААВ [10-14]

Серотипы ААВ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ЦНС	✓	✓		✓	✓				✓	✓
Скелетные мышцы	✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓
Сердце	✓		✓					✓	✓	
Печень		✓	✓					✓	✓	
Легкие		✓	✓		✓	✓			✓	
Сетчатка	✓		✓		✓					
Поджелудочная железа	✓							✓		
Почки		✓								

1.1 Создание экспрессионных векторных плазмид

Для создания лабораторного образца генного препарата необходимо клонировать кДНК целевых генов в экспрессионную векторную плазмиду для сборки ААВ рAAV-MCS (4650 п.н. Agilent Technologies, рисунок 2).

Для этого целевые гены оптимизируют по кодонному составу. Кодонная оптимизация повышает эффективность трансляции матричной РНК (мРНК) в полипептиды, тем самым повышая эффективность экспрессионных векторов, применяемых, в том числе, в генной терапии. Чем выше частота встречаемости того или иного кодона, используемого для кодирования аминокислоты в организме, тем с большей скоростью он будет транслироваться рибосомами вследствие высокой внутриклеточной концентрации транспортной РНК (тРНК), узнающей такой кодон. При этом в качестве оптимальных кодонов используют наиболее часто встречающиеся синонимические кодоны генов организма-реципиента.

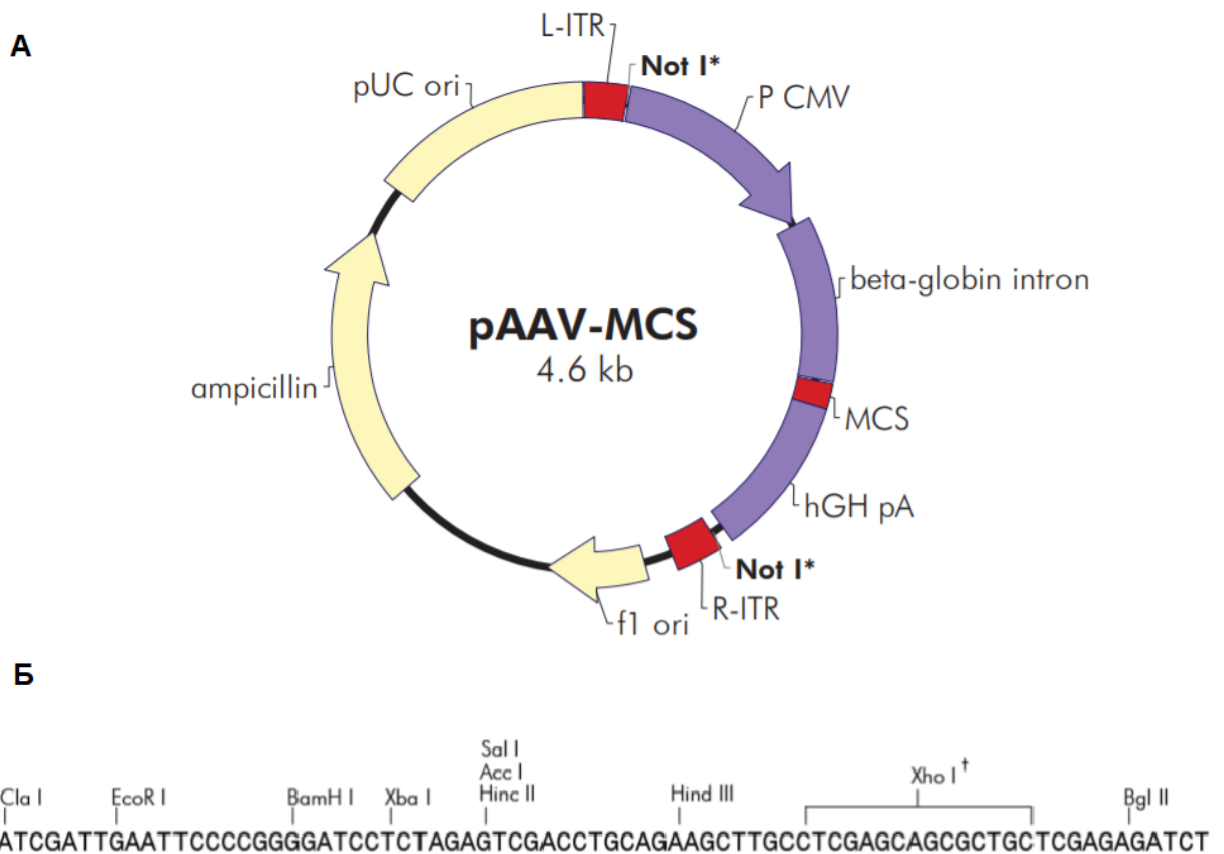


Рис. 2. А – Карта плазмиды pAAV-MCS. Б – Последовательность сайта множественного клонирования. Адаптировано из [15]

Считается, что такие модификации могут повысить эффективность экспрессии терапевтического гена. Оптимизация кодонного состава реализуется с помощью сайт направленного мутагенеза или химического синтеза нуклеотидной последовательности *de novo*. Для оптимизации кодонного состава генов используется алгоритм OptimumGene, который учитывает различные факторы, влияющие на уровни экспрессии генов, такие как смещение кодонов, GC-состав, содержание CpG-динуклеотидов, вторичную структуру мРНК, тандемные повторы, сайты рестрикции, которые могут помешать клонированию, преждевременные сайты полиаденилирования, дополнительные минорные сайты связывания с рибосомой.

Оптимизацию кодонного состава синтез *de novo* производит, например, компания GenScript (США). Генный препарат для лечения МЛД содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность кДНК гена *ARSA*, генные препараты для лечения БТС содержат кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности кДНК генов *HEXA* или *HEXB*.

Например, при оптимизации кодонного состава гена *ARSA* дикого типа был улучшен индекс адаптации кодонов CAI (англ. Codon Adaptation Index) с 0.83 до 0.90. При оптимизации кодонного состава гена *HEXA* дикого типа был улучшен индекс адаптации кодонов CAI с 0.77 до 0.93. При оптимизации кодонного состава гена *HEXB* дикого типа был улучшен индекс адаптации кодонов CAI с 0.71 до 0.93. Для увеличения стабильности мРНК был оптимизирован GC-состав и удалены протяженные участки с высоким содержанием GC-пар. Кроме того, процесс оптимизации удалил потенциальные цис-действующие сайты. В результате кодонной оптимизации аминокислотные последовательности генов *ARSA*, *HEXA* и *HEXB* не изменились и составили 481, 481 и 541 аминокислотных остатков, соответственно. Кодон-оптимизированные последовательности клонировали в плазмидный вектор pAAV-MCS в сайт множественного клонирования.

1.2 Нарботка (амплификация) экспрессионных векторных плазмид

Для наработки плазмидной ДНК в препаративных количествах необходимо получить рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, содержащие необходимые плазмиды и из полученной бактериальной биомассы выделить плазмидную ДНК.

1.2.1 Культивирование клеток *E. coli*

Для наработки экспрессионных плазмид подходит штамм *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США). Данный штамм имеет следующий генотип: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*. Для культивирования клеток *E. coli* можно использовать 2 вида питательных сред: LS-LB (среда мало солевая Лурия-Бертани) и агаризованная LS-LB (Таблицы 2 и 3).

1.2.2 Проведение генетической трансформации клеток *E. coli*

Трансформация – изменение наследственных свойств клеток в результате проникновения в них чужеродной ДНК. Состояние клеток, при котором они способны к поглощению ДНК, называют состоянием компетентности.

Таблица 2

Состав среды LS-LB (pH 7.5)

Название компонента	Количество
Триптон	10 г
Дрожжевой экстракт, без содержания солей, тип Д	5 г
Натрий хлорид NaCl 5 М	10 г
dH ₂ O	1 л

Таблица 3

Состав агаризованной среды LS-LB

Название компонента	Количество
Триптон	10 г
Дрожжевой экстракт, без содержания солей, тип Д	5 г
Натрий хлорид NaCl 5 М	10 г
Агар	5 г
dH ₂ O	1 л

Обычно максимальное число компетентных клеток наблюдается в конце фазы логарифмического роста (экспоненциальная фаза). Эта фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток, величина клеток и содержание в них белка у многих бактерий тоже остаются постоянными. В состоянии компетентности бактерии вырабатывают особый низкомолекулярный белок (фактор компетентности), активизирующий синтез аутолизина, эндонуклеазы I и ДНК-связывающего белка. Аутолизин частично разрушает клеточную стенку, что позволяет ДНК пройти через неё, а также снижает устойчивость бактерий к осмотическому шоку. В состоянии компетентности также снижается общая интенсивность метаболизма. ДНК для бактериальной трансформации должна быть двухнитевой, её длина – не менее 450 п.н. Оптимальное pH для прохождения процесса – около 7.

1.2.3 Приготовление компетентных клеток *E. coli* с использованием CaCl₂ метода

Для трансформации использовать штамм *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США), который обеспечивает высокую эффективность трансформации (около 10⁹ колониеобразующих единиц на 1 мкг

ДНК). Компетентные клетки приготовьте с использованием CaCl_2 метода. Работать в стерильных условиях ламинарного бокса.

1. Для приготовления компетентных клеток отберите одну бактериальную колонию *E. coli* TOP10, диаметром 2–3 мм, из выращиваемых на чашках Петри в течение 16–20 часов при 37 °С и внесите ее в колбу с 8 мл среды LS-LB без добавления антибиотика. Инкубируйте в течение 16 часов при 37 °С, 180 об/мин.

2. Через 16 часов 500 мкл суспензии клеток добавьте в 30 мл среды LS-LB без добавления антибиотика. Культуру инкубируйте в термостате в течение 1.5 часов при 37 °С, 180 об/мин. Для культивирования лучше использовать стеклянные колбы, закрытые фольгой, суспензия должна составлять около 30 % всего объема колбы, так как важна аэрация культуры. Рост бактерий в жидкой культуральной среде контролируется путем измерения оптической плотности (англ. optical density) при 600 нм (OD_{600}). Измерение OD_{600} используется для определения стадии роста бактериальной культуры. OD_{600} культуры для эффективной трансформации должна быть в пределах 0,5–0,8.

3. Бактериальную биомассу перенесите в 50 мл центрифужные пробирки, положите их в лед и инкубируйте в течение 10 минут. Далее пробирки центрифугируйте в охлажденной центрифуге (4 °С) в течение 10 минут, 4000 g. Далее надосадочную жидкость аккуратно слейте в стакан для отходов и, не переворачивая обратно, поставьте пробирку дном вверх на фильтровальную бумагу для удаления остатков надосадочной жидкости.

4. Осадок в каждой пробирке ресуспендируйте в 20 мл заранее приготовленного и охлажденного раствора 0,1 М CaCl_2 (1.11 г CaCl_2 , 100 мл dH_2O).

5. Полученную смесь инкубируйте на льду в течение 25 минут, после чего центрифугируйте в охлажденной центрифуге (4 °С) в течение 10 минут при 4000 g.

6. Надосадочную жидкость слейте, осадок ресуспендируйте в 500 мкл заранее приготовленного и охлажденного раствора 0.1 М CaCl_2 .

1.2.4 Генетическая трансформация компетентных клеток *E. coli* (тепловой шок)

1. В предварительно охлажденную 1,5 мл пробирку добавьте 50–100 мкл раствора компетентных клеток *E. coli* и 50–100 нг раствора плазмидной ДНК.

2. Раствор компетентных клеток с плазмидной ДНК инкубируйте на льду в течение 30 минут.

3. Проведите тепловой шок бактериальным клеткам путем инкубирования при 42 °С в течение 1 минуты (использовать водяную баню).

4. Далее пробирку с бактериями сразу переместите на лед и инкубируйте в течение 10 минут. Затем к бактериальным клеткам добавьте 1 мл среды LS-LB и инкубируйте в термостате на шейкере в течение 1 часа при 37 °С.

5. После окончания инкубации 100 мкл трансформированных бактериальных клеток рассейте (распределить шпателем) на чашку Петри с агарозной селективной средой, содержащей ампициллин (в концентрации 100 мг/мл). Все используемые в работе плазмиды содержат ген устойчивости к ампициллину. Работайте в ламинаре в стерильных условиях.

6. Чашки Петри инкубируйте в термостате в течение 14–16 часов при 37 °С. Дальнейшую работу проводите с бактериальными колониями, выросшими на селективной среде с ампициллином.

Примечание. *E. coli* не рекомендуют хранить больше двух недель при температуре +4 °С. Частый пересев колоний не рекомендован, так как он приводит к генетической нестабильности рекомбинантных плазмид и повышает вероятность спонтанных мутаций. Для криоконсервирования к клеткам добавляют криопротектор (глицерол), который не дает возможности образовываться внутри клетки кристаллам льда. Для криоконсервации бактериальной культуры *E. coli* (приготовления «стока») в 1.5 мл стерильной пробирке к 0.5 мл бактериальной культуры добавьте 0.5 мл стерильного 80 % глицерола, перемешайте на вортексе, заморозьте и храните при -80 °С.

1.2.5 Выделение плазмидной ДНК

Отдельную бактериальную колонию инокулируйте в 15 мл центрифужную пробирку, содержащую 5 мл среды с ампицилли-

ном (в концентрации 100 мг/мл) и инкубируйте в термостате в течение 14–16 часов при 37 °С с интенсивным перемешиванием (180 об/мин), после чего биомассу используйте для выделения плазмидной ДНК. Через 16 часов из трансформированных бактериальных клеток выделите плазмидную ДНК. Это можно сделать с помощью различных коммерческих наборов по методике, рекомендуемой производителем. Например, с использованием набора GeneJET Plasmid MiniprepKit (Кат. №K0502, Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Все этапы производитель рекомендует выполнять при комнатной температуре и центрифугирование проводить при скорости более 12000 g.

1. Весь объем культуры трансформированных бактериальных клеток (5 мл) центрифугируйте в 15 мл центрифужных пробирках в течение 4 минут при 4 °С. Осадок ресуспендируйте в 250 мкл раствора для ресуспендирования (50 mM Трис-НСl, 10 mM ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 100 мкг/мл РНКазы А, рН 8.0).

2. Добавьте 250 мкл лизирующего раствора (содержит ионный детергент додецилсульфат натрия (англ. sodium dodecyl sulfate, SDS) и NaOH; при его добавлении происходит разрушение клеточной мембраны) и аккуратно перемешайте, переворачивая пробирку 4–6 раз, пока раствор не станет вязким. Инкубируйте не более 5 минут.

3. Добавьте 350 мкл нейтрализующего раствора (содержит ацетат натрия или калия) и сразу перемешайте, переворачивая пробирку 4–6 раз.

4. Центрифугируйте в течение 5 минут при максимальных оборотах.

5. Перенесите супернатант в пробирки с колонками (входят в состав набора) и центрифугируйте в течение 1 минуты при максимальных оборотах и 4 °С. Далее слейте жидкость (центрифугат) из пробирки и поместите колонку обратно в пробирку.

6. Добавьте 500 мкл раствора для промывания (содержит С₂Н₅ОН) в колонку и центрифугируйте в течение 1 минуты при максимальных оборотах. Слейте центрифугат.

7. Повторите пункт 7.

8. Пробирку с пустой колонкой центрифугируйте повторно в течение 1 минуты при максимальных оборотах, чтобы удалить остатки раствора для промывания.

9. Перенесите колонку в новую 1.5 мл пробирку.

10. Добавьте 50 мкл буфера для элюирования (1.23 М NaCl, 50 mM Трис-HCl, pH 8.5, 15 % изопропанол) в центр колонки (можно нагреть до 65 °С для лучшего элюирования), инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут. Далее пробирку центрифугируйте в течение 2 минут при максимальных оборотах. В 1.5 мл пробирке остается плазмидная ДНК. Выделенную плазмидную ДНК храните при -20 °С.

Для измерения концентрации плазмидной ДНК используйте спектрофотометр, например, NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific™, США). Нанесите 2 мкл образца на неподвижный модуль прибора. В качестве бланка использовать буфер для элюирования. Сверху на образец опустить подвижный модуль прибора и измерить концентрацию образца.

1.3 Рестрикционный анализ плазмидной ДНК

Рестриктазы – это эндонуклеазы, узнающие определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК и гидролизующие ДНК внутри сайтов или вблизи них.

Перед началом работы разморозьте на льду все компоненты реакции, кроме рестриктазы (таблица 4). Поместите 1.5 мл пробирку на лед, добавьте 300 нг плазмидной ДНК, 1 мкл рестриктазы и 1 мкл буфера для рестрикции, воду без нуклеаз – столько, чтобы конечный объем реакционной смеси был 10 мкл. Таким образом, конечный объем реакционной смеси – 10 мкл. После добавления всех компонентов реакционную смесь в 1.5 мл пробирке инкубируйте в термостате в течение 1 часа при 37 °С. Пробы ДНК после рестрикционного анализа нанесите в лунки 1 % агарозного геля, добавив специальный буфер для нанесения – 6x Loading Dye (состоит из: 0.4 % оранжевого G, 0.03 % бромфенолового синего, 0.03 % ксиленицианола FF, 15 % фикола 400, 10 mM Трис-HCl pH 7.5 и 50 mM ЭДТА pH 8.0) так, чтобы его итоговая концентрация в пробе для нанесения была 1x.

Состав реакционной смеси для рестрикции

Компоненты реакции	Объем, мкл
Плазмидная ДНК	300 нг
Буфер для рестрикции	1 мкл
Рестриктаза	1 мкл
Вода без нуклеаз	Конечный объем 10 мкл

1.4 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез ДНК – аналитический метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. Электрофорез ДНК проводится в горизонтальном направлении. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно, поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду под действием сил электрического поля. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее. Для визуализации результата в расплавленную агарозу вносят флуоресцентный краситель бромистый этидий, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флуоресцирует в УФ-лучах.

Для анализа размеров полученных ДНК-фрагментов используют ДНК маркеры – линейные фрагменты ДНК известной длины. Большое значение имеет напряжение электрического поля, с увеличением которого понижается эффективность разделения. Для достижения максимальной эффективности разделения фрагментов ДНК напряженность не должна превышать 5 вольт (В) на сантиметр геля.

1. До заливки геля в ванне для электрофореза установите гребенки из оргстекла для создания лунок для нанесения образцов. Гребенки установите так, чтобы нижняя часть зубцов гребенки располагалась в 2 мм от основания геля общим объемом 50 мл (для геля, объемом 150 мл расстояние от основания геля до нижней части зубцов гребенки – 1 мм).

2. Для приготовления 100 мл 1 % агарозного геля добавьте 100 мл 1x ТАЕ (англ. Tris-acetate-EDTA, Трис-ацетат-ЭДТА) и 1 г агарозы (Sigma-Aldrich, США). Рекомендуется готовить концентрированный раствор 50x ТАЕ (Трис, 0.5 М ЭДТА рН 8.0, ледяная уксусная кислота) и разводить его до 1x ТАЕ.

3. Навеску агарозы растворите в 1x TAE с помощью нагревания до кипения таким образом, чтобы раствор стал гомогенным, то есть не содержал нерастворенных частиц агарозы.

4. После этого раствор охладите примерно до 50 °С, добавьте 3 мкл бромистого этидия (Helicon, Россия) на 100 мл геля. Залейте весь объем геля в ванну для электрофореза. После этого раствор охладите примерно до 50 °С (30–45 минут при комнатной температуре), осторожно удалите гребенки и залейте ванну для электрофореза буфером 1x TAE до тех пор, пока гель не окажется погруженным в раствор полностью.

5. Смешайте образцы с буфером для нанесения 6x Loading Dye так, чтобы его итоговая концентрация в пробе для нанесения была 1x и пипеткой внесите их в лунки агарозного геля под электрофорезный буфер.

6. Для анализа размеров полученных ДНК-фрагментов в одну из лунок добавьте 5 мкл ДНК-маркера, например GeneRuller™ DNA Ladder 1kb (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

7. Разделение ДНК проведите при напряжении 80 В.

8. После окончания электрофореза гель проанализируйте в УФ-свете на трансиллюминаторе с системой видеодокументации GelDocXR (BioRad, США).

В качестве примера на рисунке 3 показан анализ результатов рестрикционного расщепления плазмидной ДНК рAAV-ARSA при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле.

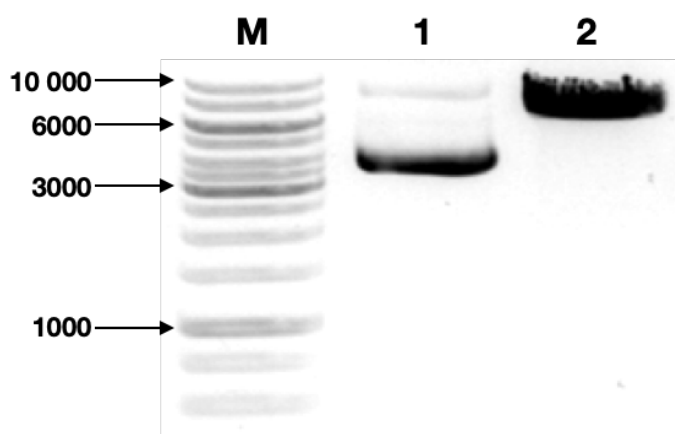


Рис. 3. Анализ результатов рестрикционного расщепления плазмидной ДНК при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле.

1 – рестрикция рAAV-ARSA ферментом *Bam*H1, 2 – кольцевая ДНК рAAV-ARSA, М — ДНК-маркер GeneRuller™ DNA Ladder 1kb

1.5 Получение рекомбинантных аденоассоциированных вирусов

В настоящее время для введения рекомбинантных нуклеиновых кислот в эукариотические клетки широко используют кальций-фосфатный метод, при котором нуклеиновая кислота образует с фосфатами комплекс, который затем поглощается клеткой. Кальций-фосфатный метод характеризуется простотой применения и низкой стоимостью, однако эффективность этого способа зависит от образования комплексов нуклеиновых кислот с фосфатом, которые чувствительны к значению pH растворов.

1. Приготовьте растворы, указанные в таблицах 5 и 6.

Таблица 5

2x HBS

Компоненты	Конечная концентрация	Количество
NaCl	280 мМ	1.636 г
HEPES	50 мМ	1.19 г
Na ₂ HPO ₄	1.5 мМ	0.056 г Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O или 0.04 г Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O
dH ₂ O		100 мл

Растворите все реагенты в воде и довести pH до 7.1 с помощью NaOH.

Таблица 6

0.3 М CaCl₂

Компоненты	Вес
CaCl ₂	3.32 г CaCl ₂ или 4.41 г CaCl ₂ *2H ₂ O
dH ₂ O	100 мл

Работать в стерильных условиях ламинарного бокса.

2. Клетки AAV293 культивируйте при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ с плотностью клеточного монослоя менее 50 % в полной среде DMEM (полная среда DMEM содержит 10 % сыворотки крови плодов коровы, L-глутамин, 1 % антибиотиков пенициллина и стрептомицина). Непосредственно перед трансфекцией плотность монослоя должна составлять 70–80 %. Для это-

го за день до трансфекции расseyте 2.2 млн. клеток на 10 см чашку Петри.

3. На следующий день проведите ко-трансфекцию тремя плазмидами (векторная плазида, рAAV-RC и рHelper) с использованием кальций-фосфатного метода. Плазмиды рAAV-RC и рHelper могут быть разными в зависимости от серотипа вируса. В 15 мл центрифужную пробирку добавьте 1 мл 0.3 М CaCl₂ и 10 мкг каждой плазмиды и аккуратно перемешайте смесь пипетированием. Подготовьте другую 15 мл центрифужную пробирку с 1 мл 2х HBS. Смесь CaCl₂ с плазмидами по каплям добавьте к раствору 2х HBS. Аккуратно перемешайте переворачиванием пробирки.

4. Сразу же (без инкубации) по каплям добавьте смесь плазмиды + CaCl₂ + 2х HBS на клетки. Осторожно покачайте чашку Петри для того, чтобы равномерно перемешать смесь со средой.

5. Инкубируйте чашку Петри в течение 6 часов при 37 °С.

6. Поменяйте культуральную среду на 10 мл свежей полной среды DMEM.

7. Инкубируйте чашку Петри при 37 °С ещё 66–72 часа.

8. Наиболее очевидным признаком производства вирусных частиц является изменение цвета среды с красного на оранжевый или желтый. Также некоторые клетки округляются и отделяются от планшета, и их можно увидеть плавающими в среде (рисунок 4). После окончания инкубации снимите клетки скребком. Для этого крышку чашки Петри положите на рабочую поверхность ламинарного бокса в перевернутом виде, с помощью серологической пипетки 5 мл среды удалите с чашки и перелейте в перевернутую крышку. Снимите клетки с помощью скребка, затем с помощью серологической пипетки соберите клетки и перенесите в чистую 15 мл центрифужную пробирку, находящуюся на льду. Наберите пипеткой 5 мл среды с крышки и используйте эту среду, чтобы тщательно смыть все оставшиеся клетки с чашки и перенесите в 15 мл центрифужную пробирку.

9. Центрифугируйте пробирку со смесью клеток при 2000 об/мин в течение 10 минут. Далее клеточный осадок и супернатант (кондиционированную среду) соберите в отдельные пробирки и используйте для концентрирования.

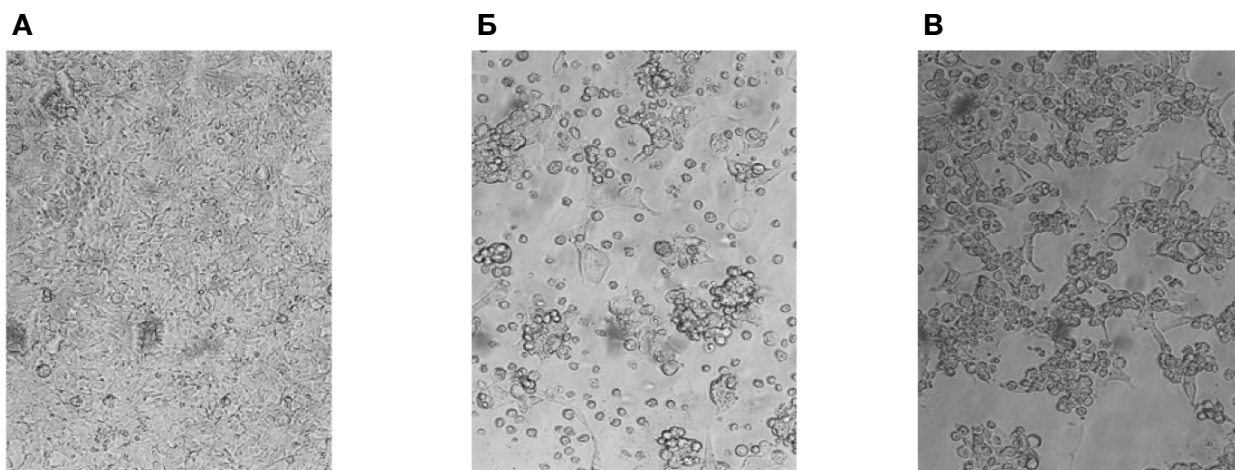


Рис. 4. Получение частиц ААВ клетками-продуцентами ААV293. А – негативный контроль. Б – третий день после трансфекции без удаления среды и плавающих клеток, шкала 100 мкм. В – третий день после трансфекции после удаления среды и плавающих клеток. Шкала 200 мкм. Адаптировано из [15]

1.6 Концентрирование ААВ

Очистка с помощью градиента йодиксанола является одним из наиболее распространенных методов очистки ААВ. Йодиксанол часто используется в медицине (является рентгеноконтрастным веществом) и в исследованиях (для очистки вирусов, выделения клеток, органелл, липопротеинов и макромолекул), он инертен и нетоксичен для клеток млекопитающих. Путем очистки в градиенте йодиксанола можно получить чистый препарат ААВ (рисунок 5), однако в составе конечного препарата часто присутствует ферритин. Если присутствие ферритина недопустимо, рекомендуется использовать дополнительные методы очистки [16].

1. Приготовьте растворы, указанные в таблицах 7–11.

Таблица 7

Приготовление буфера для лизирования ААВ

Компоненты	Конечная концентрация	Количество компонентов
NaCl	150 мМ	0.8766 г
Трис-НСl рН 8.5	50 мМ	0.6057 г
MgCl ₂	2 мМ	0.0406 г (MgCl ₂ *6H ₂ O)
dH ₂ O		100 мл

Таблица 8

Раствор для осаждения ААВ

Компоненты	Конечная концентрация	Количество компонентов
PEG-8000	40 %	40 г
NaCl	2.5 М	14.61 г
dH ₂ O		100 мл

Таблица 9

Раствор 25% дезоксихолата натрия

Компоненты	Конечная концентрация	Количество компонентов
Дезоксихолат натрия	25 %	12.5 г
dH ₂ O		50 мл

Таблица 10

10x ФСБ-МК

Компоненты	Конечная концентрация	Количество компонентов
NaCl	1.37 М	20.036 г
Гидрофосфат натрия (Na ₂ HPO ₄)	80 мМ	5.361 г (Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O)
Одноосновный фосфат калия/дигидроортофосфат калия (KH ₂ PO ₄)	20 мМ	0.68 г
MgCl ₂	10 мМ	0.508 г MgCl ₂ *6H ₂ O
KCl	27 мМ	0.503 г
dH ₂ O		250 мл

Таблица 11

Йодиксанол

	60 % йодиксанол	5 М NaCl (2.9 г в 10 мл воды)	10x ФСБ-МК	dH₂O
15 % Йодиксанол	3 мл	2.4 мл	1.2 мл	5.4 мл
25 % Йодиксанол	5 мл	-	1.2 мл	5.8 мл
40 % Йодиксанол	7.3 мл	-	1.2 мл	3.5 мл
60 % Йодиксанол	11.88 мл	-	0.12 мл	-
30 % Йодиксанол	6 мл	-	1.2 мл	4.8 мл

2. Для концентрирования ААВ используйте клеточный осадок трансфицированных клеток и супернатант из 27 чашек Петри с диаметром 10 см (или 10 чашек Петри с диаметром 15 см, общая площадь примерно 1500 см²). Осадок из всех 27 чашек объедините в одну 50 мл пробирку и ресуспендируйте в 8 мл буфера для лизирования клеток. Проведите криолиз: 3 цикла замораживания при -80 °С и оттаивания в водяной бане при 37 °С по 5–15 минут до полного замораживания или оттаивания, перемешивая на вортексе после каждого цикла. Как только лизат разморозится, немедленно поместите его снова на -80 °С. Избыточное хранение лизата при 37 °С может привести к деградации вируса. Храните неочищенный лизат в течение ночи при -80 °С, пока вирус осаждается из супернатанта (пункт 2). При необходимости неочищенный лизат можно хранить неограниченное время при температуре -80 °С.

3. Для концентрирования вирусных частиц, находящихся в кондиционированной среде, добавьте раствор для осаждения к среде в соотношении 1:4. Перемешайте путем переворачивания. Храните в течение ночи при 4 °С для осаждения белков. Далее смесь центрифугируйте при 3000 об/мин в течение 30 минут при 4 °С. Осадок соедините с клеточным лизатом (из пункта 1).

4. Добавьте ДНКазу (например, Benzonase[®] Nuclease, Sigma-Aldrich, США) к лизату в соотношении 1:10 000 для расщепления клеточной ДНК. Инкубируйте в течение 30 минут при 37 °С.

5. Добавьте 25 % дезоксихолат натрия к смеси в соотношении 1:50, перемешайте путем переворачивания и инкубируйте в течение 30 минут при 37 °С.

6. Смесь центрифугируйте при 4000 об/мин в течение 15 минут при комнатной температуре и перенесите супернатант в чистую 50 мл центрифужную пробирку.

7. Приготовьте свежие растворы йодиксанола.

8. Аккуратно без пузырей добавьте в пробирку для ультрацентрифуги (Кат. №361625, Beckman Coulter, США) растворы йодиксанола с разной плотностью так, как показано на рисунке 4, то есть так, чтобы внизу был раствор с самой высокой плотностью, а сверху с самой низкой: 10 мл 60 %, 10 мл 40 %, 11 мл 25 %, 11 мл 15 %. Это можно сделать двумя способами: а) путем наложения каждой фракции друг на друга, то есть сначала налить 60 % рас-

твор, потом медленно по стенке пробирки налить 40 % раствор, наслаивая на предыдущую фракцию и т.д.; б) или сначала налить фракцию с 15 % раствором, далее набрать в серологическую пипетку 25 % раствор, опустить пипетку до дна пробирки и аккуратно налить на дно. Не допускайте перемешивание фракций.

9. С помощью серологической пипетки перенесите 10 мл лизата в ультрацентрифужную пробирку с градиентом йодиксанола. Если остается пустое пространство, то необходимо заполнить пробирку буфером для лизиса, чтобы не осталось воздуха.

10. Взвесьте ультрацентрифужные пробирки с помощью чувствительных весов, при необходимости уравновесьте пробирки с помощью физиологического раствора или стерильной воды.

11. Закройте каждую ультрацентрифужную пробирку крышкой и перенесите в ультрацентрифугу, следя за тем, чтобы не нарушить градиент. Аккуратно установить пробирки в ротор Ti70 и загрузите ротор в ультрацентрифугу. Ротор заранее должен быть охлажден до 4 °С.

12. После центрифугирования аспирируйте границу раздела 40–60 % йодиксанола, которая содержит большую часть упакованных частиц ААВ. Для этого проткните пробирку для ультрацентрифуги примерно на 2–3 мм ниже границы 40–60 % йодиксанола с помощью шприца 18G, как показано на рисунке 4. Медленно аспирируйте 3–4 мл жидкости. Старайтесь не забирать верхнюю часть 40 % фракции, поскольку там в основном содержатся пустые частицы ААВ, клеточные белки и дезоксихолат (выглядят как белые нити). Убедитесь, что ничего из этого не аспирируется вместе с вашей фракцией!

13. Разбавьте 1:2 раствором Рингера (8.6 г NaCl, 0.3 г CaCl₂, 0.25 г KCl, 1 л dH₂O) и храните на льду. Далее можно выполнить второй этап концентрирования, если концентрация вируса не устраивает (пункт 13) или перейти к смене буфера и концентрированию с использованием специального концентратора (пункт 14).

14. Второй раунд очистки в градиенте йодиксанола выполняется так же, как первый, с некоторыми изменениями. Во-первых, поскольку плотность очищаемого образца теперь выше, фракция 15 % йодиксанола не используется. Во-вторых, фракция 25 % заменяется фракцией 30 % йодиксанола; это также необходимо из-за увеличения плотности образца. В-третьих, раствор вируса, получен-

ный после первого этапа концентрирования, следует разбавить в 2 раза раствором Рингера для уменьшения плотности препарата. Поскольку фракция йодиксанола с плотностью 15 % отсутствует, каждая пробирка может содержать примерно 15 мл образца вируса, полученного после первого этапа концентрирования. Все остальные этапы такие же, как в первом этапе концентрирования.

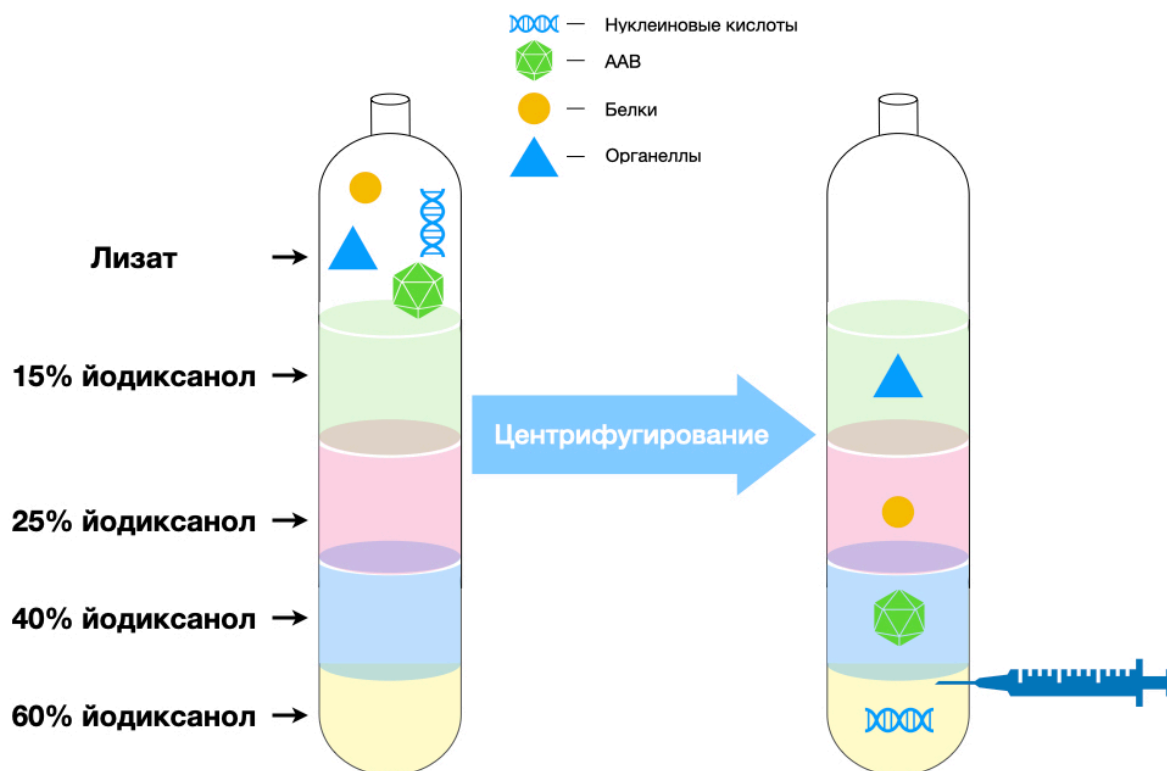


Рис. 5. Схема протокола концентрирования ААВ

15. Для смены буфера используйте концентратор, подходящий для белков с размером 50 кДа (например, Vivaspin 20, membrane 50 kDa, Sartorius, Великобритания), налейте в концентратор 20 мл раствора Рингера и центрифугируйте при 2000 об/мин при 4 °С, пока вся жидкость не пройдет через колонку (примерно в течение 10 минут).

16. Слейте центрифугат. Добавьте в концентратор разбавленный раствором Рингера вирус, полученный в пункте 11. Центрифугируйте при 2000 об/мин в течение 10 минут при 4 °С. Слейте центрифугат. Повторяйте центрифугирование до тех пор, пока вся фракция йодиксанола с вирусом не будет загружена в колонку концентратора.

17. Важно, чтобы после каждого центрифугирования в верхней части концентратора оставалось не менее 1–2 мл вируса, иначе это приведет к потере вируса. Время центрифугирования, возможно, придется отрегулировать, если фракция протекает через колонку быстрее.

18. Промойте колонку 50 мл раствором Рингера в общем объеме (вместимость концентратора составляет примерно 20 мл, чтобы промыть 50 мл раствора Рингера, необходимо сделать примерно 3 цикла промывки), путем многократного центрифугирования при 2000 об/мин в течение 10 минут при 4 °С, чтобы избавиться от остаточного йодиксанола. Каждый раз сливайте центрифугат и доливайте свежий раствор Рингера. Так же следите, чтобы в верхней части концентратора оставалось не менее 1–2 мл вируса (рисунок 6).

19. После промывки доведите объем вируса до 0.5 мл (или до 0.25 мл, если предполагаемый титр вируса низкий, что зависит от серотипа) путем центрифугирования по 2–5 минут при 2000 об/мин, постоянно проверяя объем.

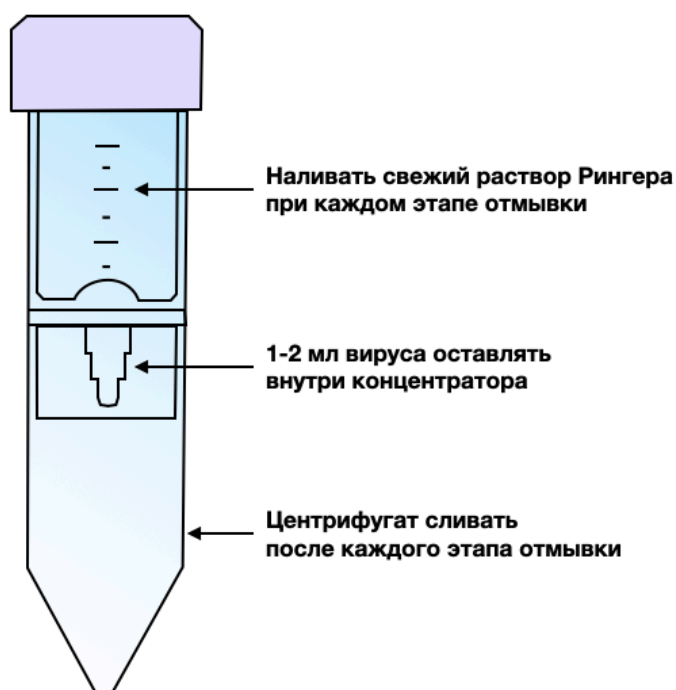


Рис. 6. Схематическое изображение концентратора

1.7 Определение титра ААВ

Титр ААВ определяют с помощью ПЦР-РВ. Количественная оценка с помощью специфичных праймеров и зондов к последовательности ITR позволяет точно определять титр различных серотипов ААВ [17, 18].

1. Обработайте образец ААВ нуклеазой (Benzonase[®] Nuclease) при 37 °С в течение 30 минут для избавления от ДНК, не заключенной в капсиды.

2. Инкубируйте образцы при 95 °С в течение 10 минут, чтобы инактивировать нуклеазу, а также разрушить вирусные капсиды.

3. Для определения титра ААВ проведите ПЦР-РВ согласно методике, описанной в разделе 2.5 с использованием праймеров и зонда на ITRs, нуклеотидные последовательности которых представлены в таблице 12.

4. Прибор считает общее количество копий гена в образце (указывается в столбце SQ mean) относительно стандартов. Значение SQ mean равно количеству вирусных частиц в 1 мкл образца.

Таблица 12

Нуклеотидные последовательности праймеров и зонда на ITRs

Прямой праймер ITR	5´-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3´
Обратный праймер ITR	5´-CGGCCTCAGTGAGCGA-3´
ITR зонд	5´-FAM-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG-BBQ-3´

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ

Анализ экспрессии генов – это изучение транскрибирования генов для синтеза функциональных генных продуктов (функциональных видов РНК или белков). Термин «экспрессия гена» охватывает период от активации гена до образования зрелого белка, выполняющего свою функцию. Исследование экспрессии в первую очередь направлено на обнаружение и количественную оценку мРНК конкретного гена. Золотым стандартом для точного измерения экспрессии генов на сегодняшний день является ПЦР-РВ (количественная ПЦР).

Для исследования функциональности разработанных генетических конструкций так же анализируется уровень экспрессии трансгена в генетически модифицированных клетках. Количество мРНК трансгена в клетках можно определить путем ПЦР-РВ, обнаружение белка и определение его количества достигается путем проведения вестерн-блот анализа, а функциональность белка детектируется путем проведения теста на ферментативную активность с использованием специальных субстратов (если трансген кодирует фермент) (рисунок 7).

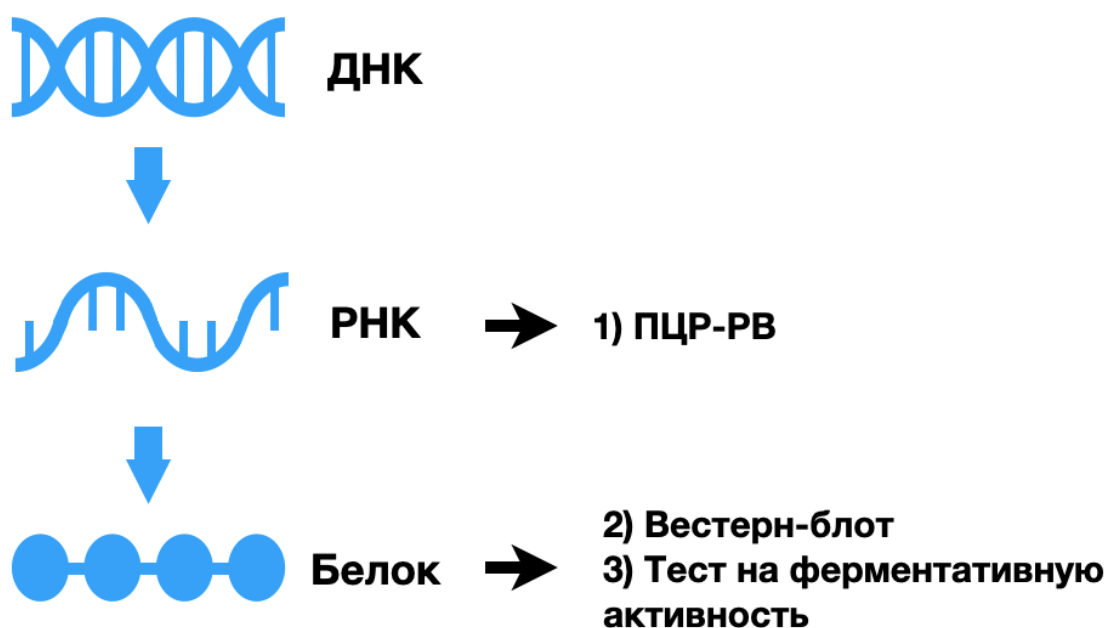


Рис. 7. Предлагаемая схема анализа функциональности генетических конструкций

2.1 Трансфекция

Трансфекция – невирусный метод доставки нуклеиновой кислоты в клетку. Эта технология переноса генов с использованием различных химических или физических методов позволяет изучать функции генов и экспрессию белков в клеточной среде.

Существуют различные реагенты для трансфекции, например, TurboFect (Thermo Fisher Scientific Inc., США) представляет собой раствор катионного полимера. Полимер и ДНК образуют компактные, стабильные, положительно заряженные комплексы, которые защищают ДНК от деградации и облегчают доставку генов в эукариотические клетки.

Работать в стерильных условиях ламинарного бокса.

1. Для трансфекции используйте культуру клеток с плотностью монослоя 70–90 %, культивируемых в 6-луночных культуральных планшетах. За день до трансфекции посейте клетки НЕК293 в 6-луночный планшет по 50 000 клеток в 4 мл полной среды DMEM, культивируйте при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂.

2. Для приготовления смеси для трансфекции в 1.5 мл стерильной пробирке смешайте 400 мкл культуральной среды DMEM без содержания сыворотки, 4 мкг плазмидной ДНК и 6 мкл трансфекционного реагента TurboFect. После чего смесь тщательно перемешайте на вортексе. Смесь рассчитана на 1 лунку 6-луночного планшета. Для отслеживания эффективности трансфекции используйте плазмидный вектор, кодирующий ген репортерного белка, например дальне-красного флуоресцентного белка *Katushka2S*. Для сравнения необходим отрицательный контроль (нативные клетки без генетической модификации) (рисунок 8).

3. Инкубируйте пробирки со трансфекционной смесью при комнатной температуре в течении 15–20 минут.

4. Затем весь объем трансфекционной смеси добавьте в лунку культурального планшета по каплям. Не удаляйте питательную среду из лунок перед добавлением трансфекционной смеси.

5. Осторожно покачайте планшет, чтобы добиться равномерного распределения реагента для трансфекции.

6. Планшет инкубируйте в течение 4 часов в инкубаторе при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, после чего в лунке поменяйте среду на полную DMEM.

7. Эффективность трансфекции оцените с помощью флуоресцентной микроскопии AxyObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) по интенсивности флуоресценции репортерного белка Katushka2S. Через 48 часов после трансфекции с помощью rAAV-Katushka2S большинство клеток должны обладать интенсивной флуоресценцией (рисунок 9).

8. Проанализируйте экспрессию трангена через 48 часов путем проведения ПЦР-РВ (2.5), вестерн-блот анализа (2.6) и теста на активность фермента (2.7 и 2.8). Для ПЦР-РВ и вестерн-блот анализа используйте клеточный осадок, для теста на активность фермента кондиционированную среду клеток.

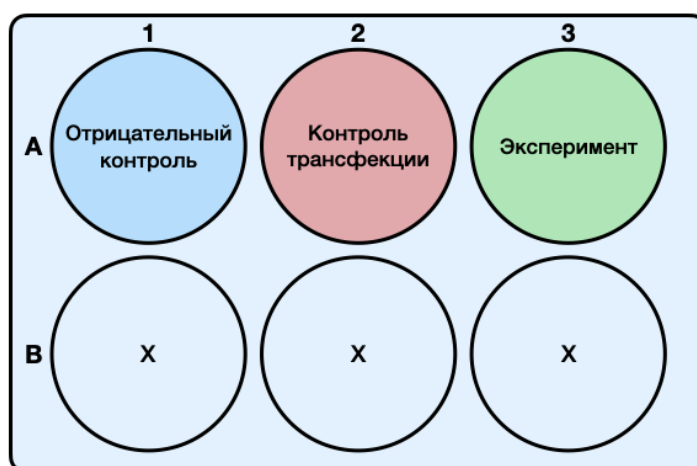


Рис. 8. – Схема планшета для трансфекции. Отрицательный контроль – нативные клетки без генетической модификации. Контроль трансфекции – клетки, генетически модифицированные с помощью плазмидного вектора, кодирующего ген репортерного белка, например дальне-красного флуоресцентного белка Katushka2S. Эксперимент – клетки, генетически модифицированные с помощью плазмидного вектора, кодирующего целевой ген (например, *ARSA*, *HEXA*, *HEXB*)

2.2 Трансдукция

Трансдукция – это процесс, при котором ДНК переносится в клетку с помощью вирусного вектора. Трансдукция ААВ требует связывания с гликановыми рецепторами клеточной поверхности. Этот ключевой шаг опосредует прикрепление вирионов к клеточной поверхности и запускает последующую интернализацию.

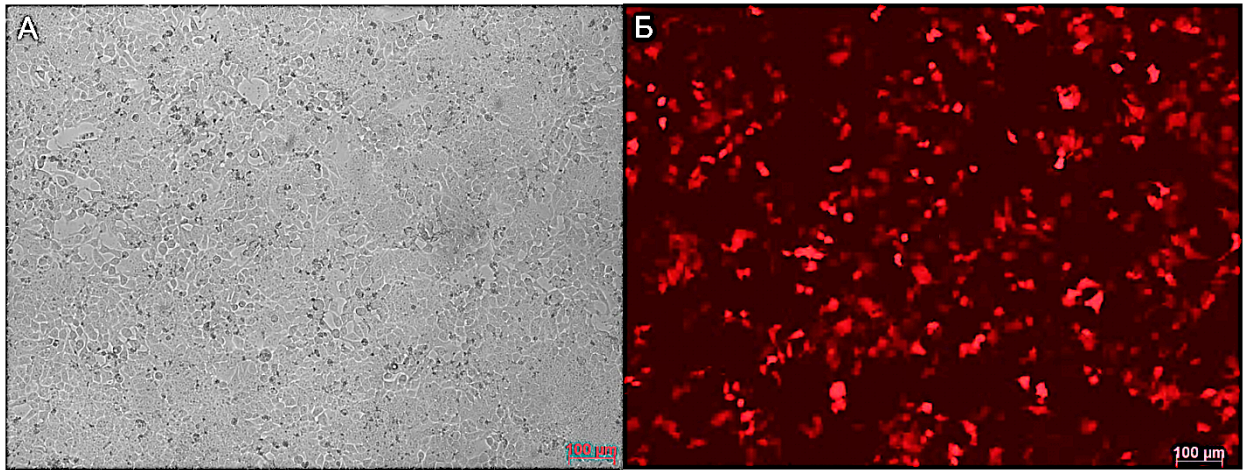


Рис. 9. Клетки HEK293, трансфицированные плазмидой pAAV-Katushka2S. 48 часов после трансфекции. А – фазово-контрастная микроскопия. Б – флуоресцентная микроскопия. Шкала: 100 мкм

Считается, что клеточный захват частиц ААВ эндоцитарными везикулами опосредуется интегринами и различными трансмембранными рецепторами, а интернализация происходит через клактрин-опосредованный эндоцитоз [19].

Работать в стерильных условиях ламинарного бокса.

1. Для генетической модификации клеток рекомбинантным ААВ за 24 часа посеять клетки в 6-луночный планшет. Клеточный монослой на следующий день должен составлять 60–70 %, поэтому количество клеток может меняться в зависимости от их размеров и скорости деления (например, мезенхимные стволовые клетки посеять примерно по 100 тыс. на лунку).

2. Приготовьте смесь для трансдукции с учетом множественности инфекции 100 (англ. multiplicity of infection, MOI, отношение количества вирусных частиц к количеству клеток-мишеней). MOI 100 для мезенхимных стволовых клеток составляет 100 000 вирусных частиц на одну клетку (таблица 13). В качестве контроля трансдукции используйте ААВ, кодирующий ген репортерного белка, например, дальне-красного флуоресцентного белка. В качестве отрицательного контроля – нативные клетки без генетической модификации.

3. Смените среду клеток на приготовленную смесь для трансдукции.

4. Через 6 часов поменяйте среду на свежую. На 4–6 сутки после трансдукции проанализируйте уровень экспрессии репортерного трансгена (рисунок 10).

5. Также через 4–6 суток проанализируйте экспрессию трансгена путем проведения ПЦР-РВ (2.5), вестерн-блот анализа (2.6) и теста на активность фермента (2.7 и 2.8). Для ПЦР-РВ и вестерн-блот анализа используйте клеточный осадок, для теста на активность фермента кондиционированную среду клеток.

Таблица 13

Приготовление смеси для трансдукции

Компонент	Количество
ААВ	100 000 вирусных частиц/клетка
Протамина сульфат	10 мкг (1 мкл стокового раствора с концентрацией 10 мг/мл)
Культуральная среда без добавления сыворотки	1000 мл

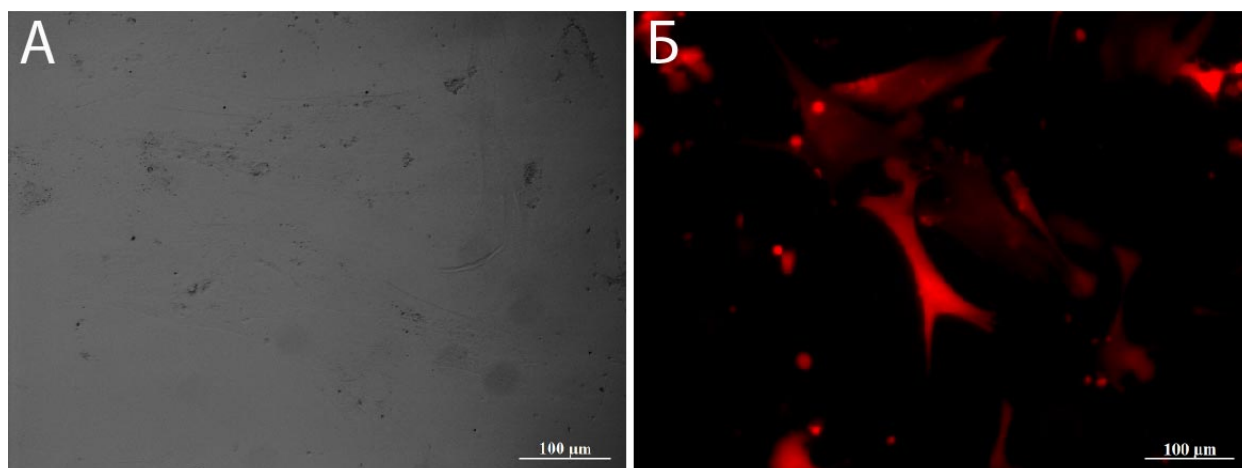


Рис. 10. Трансдукция мезенхимных стволовых клеток (МСК) с помощью ААV-Katushka2S, 6 сутки после трансдукции. А — фазово-контрастная микроскопия. Б — флуоресцентная микроскопия.

Шкала: 100 мкм

2.3 Выделение РНК с помощью TRI реагента

РНК из клеток выделите с использованием TRI реагента, который представляет собой смесь тиоцианата гуанидина и фенола в однофазном растворе, который используется для выделения ДНК, РНК и белка из биологических образцов человека, животных, растений, дрожжей, бактерий и вирусов.

Через 48 часов после трансфекции и 4–6 суток после трансдукции клетки снимите с культуральной посуды с помощью трипсин-ЭДТА, осадите путем центрифугирования в течение 5 минут

при 1400 об/мин. Осадок отмыть 2 раза, ресуспендируя клетки в физиологическом растворе и центрифугируя 5 минут при 1400 об/мин.

1. Добавьте TRI реагент к осадку клеток, с учетом того, что 1 мл реагента рассчитан на количество адгезивных клеток, культивируемых на поверхности культурального пластика площадью 10 см². Ресуспендируйте клетки в TRI реагенте и инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре.

2. Добавьте 0.1 мл 1-бром-3-хлорпропана или 0.2 мл хлороформа на 1 мл используемого TRI реагента.

3. Смесь перемешайте в течение 15 секунд на вортексе.

4. Инкубируйте смесь в течение 2–15 минут при комнатной температуре.

5. Центрифугируйте смесь в охлажденной центрифуге (4 °C) при 12 000 g в течение 15 минут. Центрифугирование разделяет смесь на 3 фазы: красную органическую фазу (содержащую белок), промежуточную белую фазу (содержащую ДНК) и бесцветную верхнюю водную фазу (содержащую РНК).

6. Перенесите водную фазу в чистую пробирку.

7. Добавьте 0.5 мл изопропанола на 1 мл TRI реагента. Смесь перемешайте на вортексе.

8. Смесь инкубируйте в течение 5–10 минут при комнатной температуре.

9. Центрифугируйте смесь в охлажденной центрифуге (4 °C) при 12 000 g в течение 10 минут.

10. Удалите супернатант, добавьте минимум 1 мл 75 % этанола на 1 мл TRI реагента. Смесь перемешайте на вортексе.

11. Центрифугируйте смесь в охлажденной центрифуге (4 °C) при 7500 g в течение 5 минут.

12. Осторожно удалите супернатант, не трогая осадок, оставьте образец в ламинаре на 5–10 минут, открыв крышку пробирки, для высушивания РНК от спирта.

13. Растворите в 50 мкл воды без нуклеаз (подойдет автоклавируемая деионизированная вода).

2.4 Синтез кДНК

Комплементарная ДНК (кДНК, англ. cDNA) представляет собой ДНК, синтезированную на матрице зрелой мРНК. Для получе-

ния кДНК используют обратную транскриптазу, также известную как РНК-зависимая ДНК-полимераза. Данный процесс синтеза кДНК называется обратная транскрипция [20, 21].

Измерьте концентрацию образцов РНК с помощью спектрофотометра (NanoDrop ND-2000, Thermo Scientific, США). Нанесите 2 мкл образца на неподвижный модуль прибора. Сверху на образец опустите подвижный модуль прибора.

1. Используйте 1000 нг РНК в качестве матрицы для синтеза кДНК. Все реагенты для синтеза кДНК положите на лед для оттаивания, после чего перемешайте и осадите их на вортексе, чтобы весь объем растворов оказался на дне пробирки. Все манипуляции проводите на льду.

2. В стерильную пробирку без нуклеаз добавьте реагенты, указанные в таблице 14.

Таблица 14

Смесь образцов РНК с рандомным праймером

Компоненты	Количество
Образец РНК	1000 нг
Рандомный праймер (500 мкМ)	0.5 мкл
Вода без нуклеаз	Доведите до 13.7 мкл (зависит от концентрации РНК)

3. Далее установите пробирку в амплификатор (Thermal Cycler, Bio-Rad, США) для отжига рандомного праймера на 5 минут при 65 °С.

4. Через 5 минут добавьте реакционную смесь для синтеза кДНК, состав которой приведен в таблице 15, осторожно перемешайте и осадите на вортексе. Далее установите пробирку в амплификатор для синтеза кДНК. Установите следующий температурный режим: 25 °С – 10 минут, 42 °С – 1 час, 70 °С – 10 минут, 4 °С – хранение. Полученную кДНК можно сразу использовать для ПЦР или хранить при -20 °С.

Реакционная смесь для синтеза кДНК

Компоненты	Количество
5X Реакционный буфер для обратной транскрипции (5X Reaction Buffer for RT, Thermo Scientific™, США)	4 мкл
Ингибитор РНКаз (RiboLock RNase Inhibitor, 40 ед/мкл, Thermo Scientific™, США)	0.5 мкл
Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP, 25 мМ, Thermo Scientific™, США)	0.8 мкл
Обратная транскриптаза (RevertAid Reverse Transcriptase, 200 ед/мкл, Thermo Scientific™, США)	0.5 мкл

2.5 Полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ на основе TaqMan – метод количественной ПЦР, в котором используются флуоресцентные одноцепочечные олигонуклеотидные зонды, которые связываются с последовательностью ДНК между двумя праймерами и генерируют флуоресцентные сигналы. Специфичный последовательности гена зонд с одной стороны мечен флуорофором, а с другой – гасителем флуоресценции. Благодаря 5'–3' экзонуклеазной активности Taq-полимеразы флуорофор и гаситель отщепляются от зонда флуорофор оказывается способен генерировать флуоресцентный сигнал (рисунок 11) [22].

1. Праймеры и пробы, специфичные к генам *ARSA*, *HEXA* и *HEXB*, были разработаны с помощью специальной программы GenScript Online Real-time PCR (TaqMan) Primer Design Tool (GenScript, США) и синтезированы компанией Евроген (Россия) (таблица 16).

2. Разморозьте все необходимые реагенты на льду. После разморозки перемешайте реагенты на вортексе и осадите центрифугированием, чтобы весь объем реагента оказался на дне. Каждый реагент перед добавлением необходимо перемешивать на вортексе и осаждайте центрифугированием. Все манипуляции проводите при выключенном свете, на льду или на холодной подставке.

3. Приготовьте смесь праймеров и пробы согласно таблице 17.

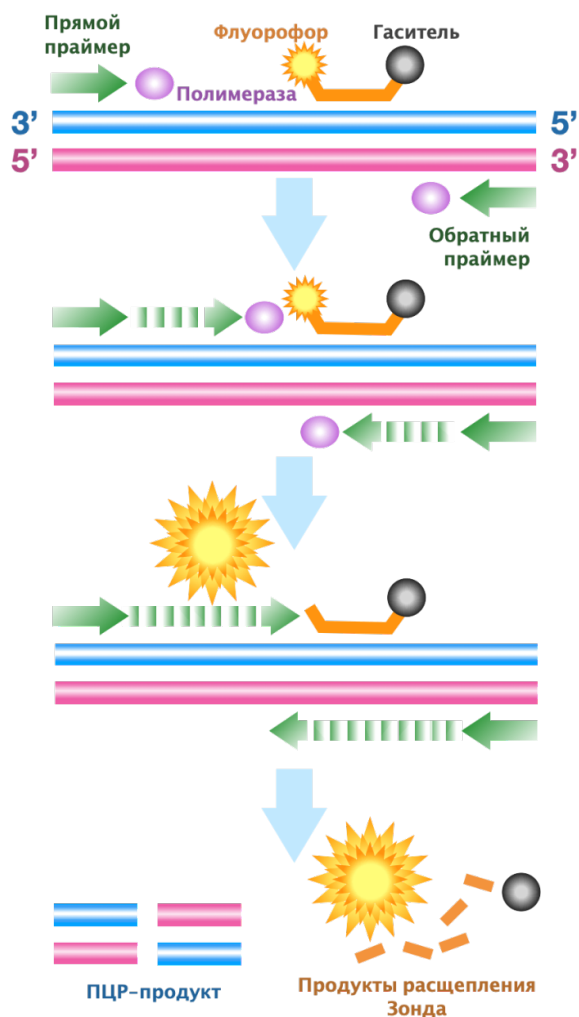


Рис. 11. Принцип ПЦР-РВ на основе TaqMan

Таблица 16

Нуклеотидная последовательность праймеров и проб

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'–3'
HEXA прямой	GACACACTGGATGTGATGGC
HEXA обратный	TGTGGGTCACGGGATTGTAA
HEXA зонд	(6-FAM) CCACTGGCACCTGGTGGACGA (BHQ-1)
HEXB прямой	ATGCCATGGCCTTCAACAAG
HEXB обратный	CAGCTCTGGAAAGGTGATGC
HEXB зонд	(6-FAM) CGTCCACGATGTGCCAGTGCAGC (BHQ-1)
ARSA прямой	CAAGGTACATGGCATTCGCA
ARSA обратный	CTGTGGATAGTGGGTGTGGT
ARSA зонд	(6-FAM) CCTGCCGCTGTGCATCTGCCA (BHQ-1)

Таблица 17

Приготовление смеси праймеров и пробы

Компоненты	Количество
Прямой праймер (100 мкМ)	3 мкл
Обратный праймер (100 мкМ)	3 мкл
Проба (100 мкМ)	1 мкл
Вода	63 мкл

4. Приготовьте реакционную смесь для ПЦР-РВ. В таблице 18 указано количество, соответствующее на одну реакцию. Рассчитайте количество реакций, учитывая 3 технических повтора всех образцов, негативного контроля и стандартов (пример представлен на рисунке 12) и рассчитайте объем реакционной смеси (учитывая ошибку пипетки, при раскапывании образцов: рассчитать на три реакции больше необходимого).

Примечание. Негативный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо образца или стандарта вносится соответствующее количество деионизованной воды. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие контаминации и исключения ложноположительных результатов.

Стандарты используются для определения количества копий гена в образце кДНК. Стандартом может служить плазида, содержащая исследуемый ген. Для этого готовят растворы с содержанием 10^4 , 10^5 , 10^6 копий гена. На основе этих стандартов прибор строит калибровочный график, из которого определяет количество копий гена в исследуемых образцах кДНК.

Таблица 18

Приготовление реакционной смеси для ПЦР-РВ

Компоненты	Количество на одну реакцию
5x Реакционный буфер для ПЦР-РВ	2 мкл
Смесь праймеров и пробы	1.4 мкл
Вода	5.6 мкл
кДНК	1 мкл

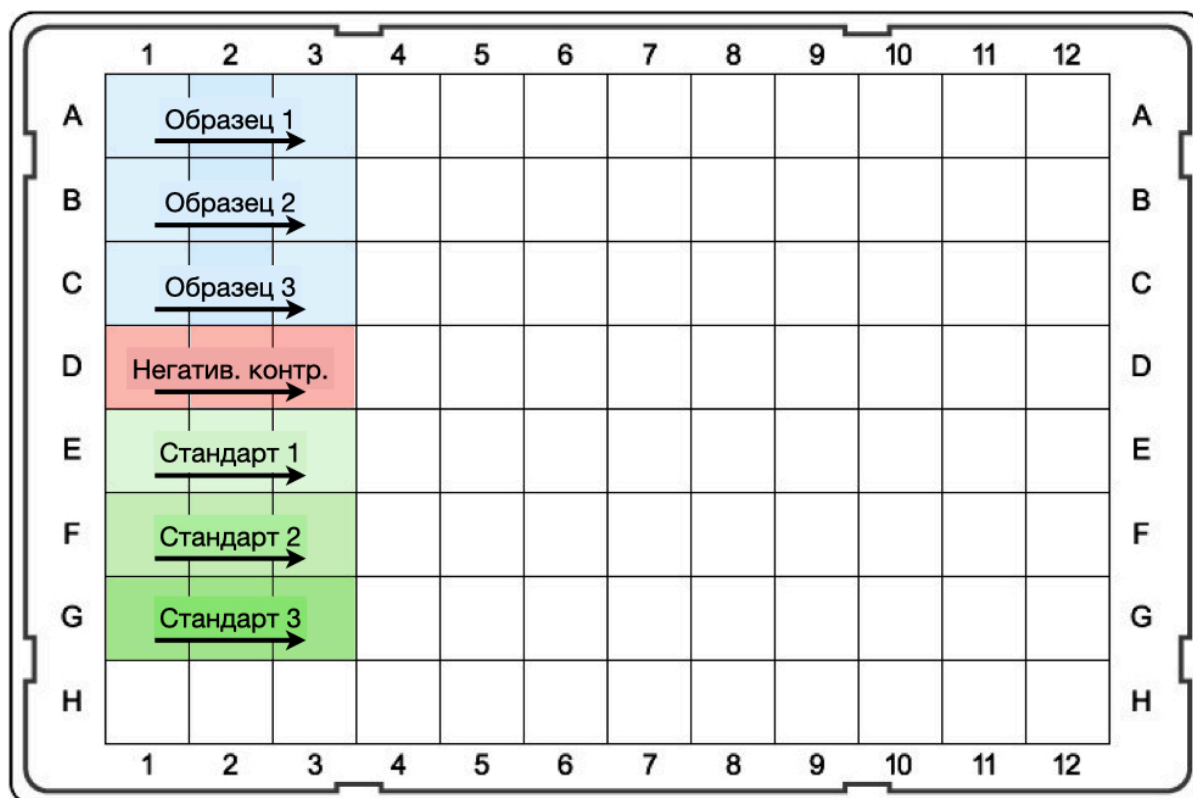


Рис. 12. Пример схемы планшета для ПЦР-РВ

5. Перенесите 9 мкл реакционной смеси для ПЦР в каждую лунку 96-луночного планшета для ПЦР. Планшет должен находиться на холодной подставке.

6. Внесите по 1 мкл каждого образца кДНК, стандарта или воды (негативный контроль).

7. Закройте планшет оптически прозрачной пленкой (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Thermo Scientific, США) для ПЦР-РВ, не трогая поверхность пленки руками. Для того, чтобы приклеить пленку использовать специальный шпатель или плотную бумагу.

8. Установите планшет в ПЦР-амплификатор CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, США).

9. Установите следующий температурный режим циклирования: предварительный нагрев при 95 °С – 5 минут, 35 циклов денатурации при 95 °С – 10 секунд, отжиг при 55 °С – 30 секунд, 35 циклов.

В качестве примера на рисунке 13 показан анализ уровней мРНК генов *HEXA* и *HEXB* в нативных и генетически модифицированных МСК. В МСК, генетически модифицированных рекомбинантными AAV-HEXA и AAV-HEXB, обнаружено 6 430 894,5 и

20 937 243 копий генов *HEXA* и *HEXB*, соответственно, на 1 мкг общей РНК.

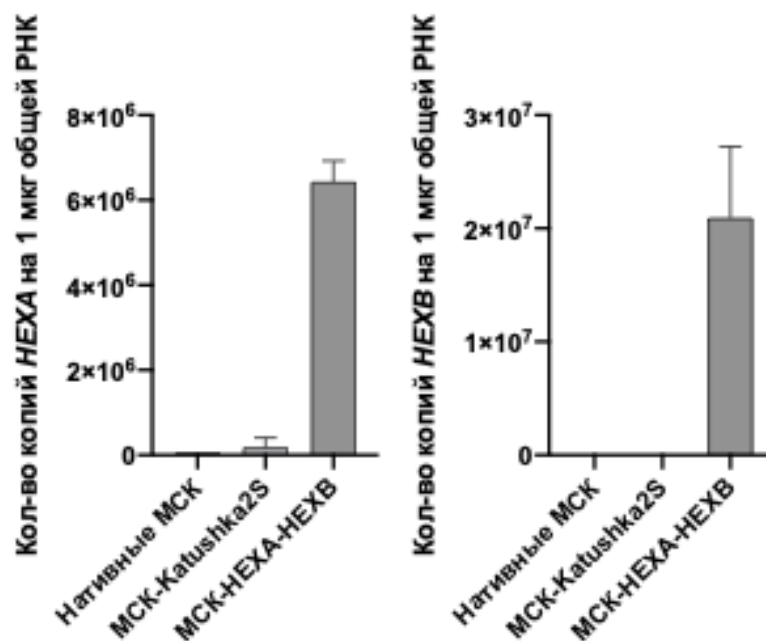


Рис. 13. Анализ уровней мРНК генов *HEXA* и *HEXB*. Нативные МСК – мезенхимные стволовые клетки без генетической модификации. МСК-Katushka2S – мезенхимные стволовые клетки, трансдуцированные с помощью AAV-Katushka2S. МСК-HEXA-HEXB – мезенхимные стволовые клетки, трансдуцированные с помощью AAV-HEXA и AAV-HEXB

2.6 Выделение белка и вестерн-блот анализ

2.6.1 Выделение белка

Через 48 часов после трансфекции и 4–6 суток после трансдукции клетки снимите с культуральной посуды с помощью скребка (без использования трипсина), осадите путем центрифугирования в течение 5 минут при 1400 об/мин и осадок отмойте 2 раза ресуспендируя клетки в физиологическом растворе, центрифугировать 5 минут при 1400 об/мин

1. Клеточный осадок ресуспендируйте в 200 мкл RIPA буфера (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 1 % тритон, 0.5 % дезоксихолат натрия, 0.1 % SDS) и добавьте 2 мкл ингибитора протеиназ (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific™, США).

2. Инкубируйте смесь на льду в течение 30 минут, далее центрифугируйте в охлажденной центрифуге (4 °С) течение 30 минут при 13200 g.

3. Супернатант перенесите в новую пробирку и храните при -80 °С.

2.6.2 Нормализация по общей концентрации белка

1. Общую концентрацию определите с использованием набора для анализа белков Pierce™ BCA (Кат. №23225, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для этого сначала необходимо приготовить стандарты, представляющие собой разные разведения альбумина. В таблице 19 приведен алгоритм получения необходимых концентраций альбумина.

Таблица 19

Приготовление разведений альбумина

	Объем воды (мкл)	Объем (мкл)	Конечная концентрация стандарта (мкг/мл)
А	0	300 стокового раствора (2000 мкг/мл)	2000
Б	125	375 стокового раствора (2000 мкг/мл)	1500
В	325	325 стокового раствора (2000 мкг/мл)	1000
Г	175	175 из Б	750
Д	325	325 из В	500
Е	325	325 из Д	250
Ж	325	325 из Е	125
З	400	100 из Ж	25
И	400	0	0 = бланк

2. Далее приготовьте раствор для определения концентрации белка, для этого нужно смешать реагент А и реагент В в соотношении 50:1. Для определения необходимого объема раствора нужно посчитать количество лунок с образцами и стандартами, учитывая повторы (минимум 3 повтора). Используйте 80 мкл раствора на каждую лунку.

3. Внесите в 96-луночный планшет по 10 мкл каждого образца и стандарта.
4. Добавьте по 80 мкл рабочего раствора в каждую лунку и тщательно перемешать планшет на шейкере в течение 30 секунд.
5. Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут при 37 °С.
6. Охладите планшет до комнатной температуры. Измерьте оптическую плотность при 562 нм с использованием спектрофотометра (Infinite M200Pro Tecan, Швейцария).

2.6.3 Вестент-блот анализ

Вестерн-блот – это экспериментальный метод, используемый для визуализации и идентификации белков. Метод включает разделение белков с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле, их перенос на мембрану и селективное иммунодетектирование антигена, с помощью антител, специфичных к нужному белку. Вестерн-блот проводят по системе Лаэмли (Laemmli) в денатурирующих условиях (SDS-PAGE).

1. Приготовьте растворы и буферы, указанные в таблицах 20-30.

Таблица 20

30 % акриламид/бис

Компонент	Конечная концентрация	Количество
Акриламид	29.2 г/100 мл	87.6 г
N,N'-Метилен-бис-акриламид	0.8 г/100 мл	2.4 г
dH ₂ O		300 мл

Отфильтруйте с помощью фильтра с фильтром, например, из полиэфирсульфона с размерами пор 0.2 мкм (Whatman Puradisc, Великобритания) и храните при 4 ° С в темноте (максимум 30 дней).

Таблица 21

10 % додецилсульфат натрия (англ. Sodiumdodecylsulfate, SDS)

Компонент	Количество
SDS	10 г
dH ₂ O	100 мл

Растворите в 90 мл деионизированной воды при осторожном перемешивании и доведите до 100 мл деионизированной водой.

Таблица 22

1.5 М Трис-НСl, рН 8.8

Компонент	Количество
Трис-НСl	27.23 г
dH ₂ O	150 мл

Сначала растворите в 80 мл деионизированной воды, доведите рН до 8.8 с раствором НСl. Доведите общий объем до 150 мл деионизированной водой и храните при 4 °С.

Таблица 23

0.5 М Трис-НСl, рН 6.8

Компонент	Количество
Трис-НСl	6 г
dH ₂ O	100 мл

Сначала растворите в 60 мл деионизированной воды, доведите рН до 6.8 с раствором НСl. Доведите общий объем до 100 мл деионизированной водой и храните при 4 °С.

Таблица 24

Буфер для внесения образцов

Компонент	Количество
100 % Раствор глицерина	2.5 мл
0.5 М Трис-НСl рН 6,8	1.25 мл
10 % SDS	2.0 мл
0.5 % Раствор бромфенолового синего	0.2 мл
dH ₂ O	3.55 мл

Инкубируйте при 50–60 °С до полного растворения. Храните при комнатной температуре. Использование: перед использованием добавьте 50 мкл β-меркаптоэтанола к 950 мкл буфера для образцов. Разбавьте образец буфером для образцов как минимум 1:2 и нагрейте при 95 °С в течение 4 минут.

Таблица 25

10x электордный буфер для электрофореза белков, рН 8.3

Компонент	Количество
Трис	30.3 г
Глицин	144.0 г
SDS	10.0 г
dH ₂ O	1 л

Растворите все компоненты и доведите общий объем до 1000 мл деионизированной водой. Не меняйте рН кислотой или щелочью. Храните при 4 °С. В случае выпадения осадков перед использованием нагрейте до комнатной температуры. Использование: разбавьте 50 мл 10-кратного исходного раствора 450 мл деионизированной воды для каждого цикла электрофореза. Перед применением тщательно перемешайте.

Таблица 26

Буфер для переноса

Компоненты	Количество
Трис-НСl рН 8.8	3.02 г
Глицин	14.41 г
Метанол	200 мл
dH ₂ O	1 л

Таблица 27

10 % персульфат аммония (англ. ammonium persulfate, APS)

Компоненты	Количество
APS	500 мг
dH ₂ O	5 мл

Рекомендуется каждый раз делать свежий раствор, однако несколько месяцев аликвоты можно хранить при -20 °С.

Таблица 28

Фосфатно-солевой буфер (англ. Phosphate buffered saline, 0.1 % Tween[®] 20 detergent PBST)

Компоненты	Количество
Фосфатно-солевой буфер (таблетки)	20 штук
Tween-20	2 мл
dH ₂ O	2000 мл

2. Подготовьте полиакриламидный гель с градиентом концентрации акриламида, которая зависит от размера анализируемого белка. Обычно концентрирующий (верхний) гель делают 4 %, а разделяющий (нижний) гель в зависимости от размера белка. Чем больше размер белка, тем ниже концентрация акриламида (таблица 29). В таблице 30 представлен состав гелей с разной концентрацией акриламида. Приготовьте раствор, смешав все реагенты, кроме ТЕМЕД и 10 % APS. Смесь дегазируйте в течение 15 минут.

Таблица 29

Зависимость процентного содержания акриламида геля от размера анализируемого белка

Размер белка	Процентное содержание акриламида
4–40 кДа	20 %
12–45 кДа	15 %
10–70 кДа	12.5 %
15–100 кДа	10 %
25–100 кДа	8 %

Таблица 30

Приготовление гелей для электрофореза

Процент акриламида	dH ₂ O (мл)	30 % акриламид (мл)	*Буфер (мл)	10 % SDS
4 %	6.1	1.3	2.5	0.1
5 %	5.7	1.7	2.5	0.1
6 %	5.4	2.0	2.5	0.1
7 %	5.1	2.3	2.5	0.1
8 %	4.7	2.7	2.5	0.1
9 %	4.4	3.0	2.5	0.1
10 %	4.1	3.3	2.5	0.1
11 %	3.7	3.7	2.5	0.1
12 %	3.4	4.0	2.5	0.1
13 %	3.1	4.3	2.5	0.1
14 %	2.7	4.7	2.5	0.1
15 %	2.4	5.0	2.5	0.1
16 %	2.1	5.3	2.5	0.1
17 %	1.7	5.7	2.5	0.1

*1.5 М Трис-НСl рН 8.8 – для разделяющего (нижнего) геля

*0.5 М Трис-НСl рН 6.8 – для концентрирующего (верхнего) геля

Перед заливкой гелей убедитесь в том, что стекла для заливки чистые и сухие. Непосредственно перед заливкой геля к 10 мл приготовленного раствора разделяющего (нижнего) геля добавьте 50 мкл 10 % APS и 5 мкл ТЕМЕД, концентрирующего (верхнего) геля 50 мкл 10 % APS и 10 мкл ТЕМЕД. Осторожно перемешайте, чтобы инициировать полимеризацию. После того как залили разделяющий (нижний) гель, нужно сверху наслоить 150–300 мкл изопропанола для ровной полимеризации. Дайте гелю полимеризоваться в течение 15–25 минут. После того как гель застыл, удалите изопропанол, залейте верхний гель и вставьте гребенки между стеклами. Дайте гелю полимеризоваться в течение 15–25 минут.

3. Перед нанесением образцы смешайте с буфером для образцов (1 часть буфера, 5 частей образца), нагрейте до 95 °С в течение 5 минут для денатурации белка.

4. Установите камеру для электрофореза на ровную горизонтальную поверхность, установите гель в камеру для электрофореза. Добавьте электродный буфер до указанного на камере уровня. Осторожно уберите гребенку и тщательно промойте лунки буфером с помощью пипетки. Повторите то же самое для второго готового геля.

5. В первую лунку добавьте 6–7 мкл маркера (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™, США) и по 30 мкг белка внесите в каждую лунку. Загружайте образцы медленно, чтобы они равномерно осели на дне лунки. Будьте осторожны, чтобы не проколоть дно лунки наконечником пипетки.

6. Электрофорез проводите при напряжении 80 В, около 20 минут, пока образцы не достигнут до границы гелей, далее 150 В 1.5 часа при комнатной температуре.

7. После завершения электрофореза (краситель должен достичь до нижнего края разделяющего геля) выключите источник питания, отсоедините электрические провода, снимите крышку ванны, осторожно извлеките камеру с гелями, слейте буфер, и извлеките гели, осторожно разделив стекла. Верхний гель аккуратно срежьте, нижний гель используйте далее для переноса белков на мембрану.

8. Подготовьте мембрану размером 7×9 см, поместите в контейнер с метанолом и инкубируйте в течение 3 минут, а затем переместите в буфер для переноса и инкубируйте в течение 15 минут. Толстую фильтровальную бумагу размером 7×9 см и гель после электрофореза также инкубируйте в буфере для переноса в течение 5 минут.

9. Соберите «сэндвич» как показано на рисунке 14 в приборе для переноса Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, США). Используйте нитроцеллюлозную мембрану (Nitrocellulose Membrane, Bio-Rad) или мембрану из поливинилидендифторида (Immun-Blot[®] PVDF, Bio-Rad, США). Поверхности прибора, соприкасающиеся с «сэндвичем», намочите буфером для переноса. Аккуратно сверху прокатите «сэндвич» валиком. Перенос производите при 17 В в течение 40 минут.



Рис. 14. Схема сбора «сэндвича» для переноса белков на мембрану

10. После переноса белков на мембрану для предотвращения неспецифического связывания антител с нецелевыми белками инкубируйте мембрану в блокирующем буфере (2.5 г сухого обезжиренного молока растворить в 50 мл PBST), белок из разбавленного раствора прикрепляется к мембране во всех местах, где не прикрепился целевой белок. Поэтому при добавлении антител единственное свободное место на мембране, куда они могут прикрепиться, — это сайты связывания на специфичных целевых белках. Аккуратно возьмите пинцетом мембрану и поместите в пробирку с 50 мл блокирующего буфера. Инкубируйте мембрану в течение 1 часа при комнатной температуре на орбитальном шейкере (Multi Bio RS-24, BioSan, Латвия).

11. Затем мембрану инкубируйте с первичными моноклональными антителами к исследуемому белку, например, ARSA (Кат. №PAA195Hu22 Cloud-Clone Corp., США), HEXA (Кат.

№PAA195Hu22 Cloud-Clone Corp., США) или HEXB (Кат. №PAA637Hu22 Cloud-Clone Corp., США). Мембрану сразу перенесите в новую пробирку с заранее приготовленным раствором первичных антител (3 мл PBST, 150 мкг БСА (бычий сывороточный альбумин), антитела в разведении 1:300). Инкубируйте при 4 °С на орбитальном шейкере в течение ночи.

12. После завершения инкубации с первичными антителами мембрану отмойте. Для отмывки проинкубируйте ее 4 раза в растворе PBST по 15 минут в 30 мл PBST и при постоянном перемешивании.

13. Инкубируйте мембрану со вторичными антителами к иммуноглобулину G человека (поликлональные антитела козы конъюгированные с пероксидазой хрена, Sigma-Aldrich, Кат. №A6154, США). Мембрану сразу перенесите в новую 50 мл пробирку с заранее приготовленным раствором вторичных антител (5 мл PBST, 250 мкг БСА, антитела в разведении 1:1000) Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 часов.

14. После завершения инкубации мембраны отмойте 4 раза по 15 минут в 30 мл PBST.

15. Как контроль загрузки инкубируем мембрану с β -актином (monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich, Кат. №A5441, США) 5 мл PBST, 250 мкг БСА, антитела в разведении 1:5000. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 часов. Гены домашнего хозяйства и белки (в том числе β -актин) используются в качестве внутреннего контроля, так как они синтезируются конститутивно.

16. После завершения инкубации мембраны отмойте 4 раза по 15 минут в 30 мл PBST.

17. Визуализацию иммунного преципитата проводите с помощью субстрата ECL Western Blotting Substrate (Кат. №W1001, Promega, США). Смешайте субстраты luminal и HRP по 500 мкл. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 3 минут, затем аккуратно по каплям нанесите на мембрану, инкубируйте в течение 3 минут. Визуализируйте мембрану с помощью системы геледокументирования ChemiDocXRS+ (BioRad, США). На рисунке 15 представлен пример результата вестерн-блот анализа.

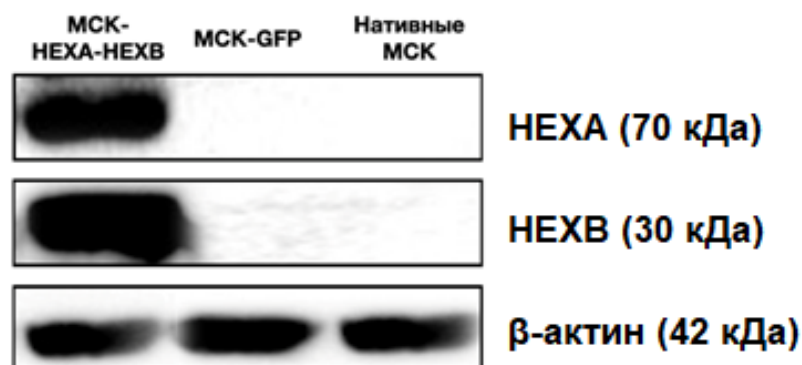


Рис. 15. Вестерн-блот анализ белков в генетически модифицированных клетках HEK293. Электрофорез в 12 % SDS-PAGE геле по системе Лаэмли. Антитела к HEXA и антитела к HEXB использовали в разведении 1:300. Ожидаемый размер белка HEXA – 70 кДа, HEXB – 30 кДа. МСК-HEXA-HEXB – мезенхимные стволовые клетки, ко-трансдуцированные AAV-HEXA и AAV-HEXB. МСК-GFP – мезенхимные стволовые клетки, трансдуцированные AAV-GFP. Нативные МСК – мезенхимные стволовые клетки без генетической модификации

2.7 Определение ферментативной активности ARSA

Фермент ARSA расщепляет широкий спектр субстратов, включая синтетические сульфаты эфиров с оптимальным значением pH 5–6 [23]. Для оценки активности фермента в исследованиях и диагностике МЛД используют искусственные субстраты, например, *p*-нитрокатехол сульфат (*p*.nitrocatechol-sulfate, *p*.NCS) [24].

1. Приготовьте раствор, указанный в таблице 31.

Таблица 31

Рабочий раствор		
Компоненты	Конечная концентрация	Количество
<i>p</i> .NCS	0.01M	0.155 г
CH ₃ COONa	0,5 M	2.0508 г
Na ₄ P ₂ O ₇	5×10^{-4}	10 мг (Na ₄ P ₂ O ₇ *10H ₂ O)
NaCl	10%	5 г
dH ₂ O		50 мл

2. К 50 мкл образца кондиционированной среды клеток (через 48 часов после трансфекции или 4-6 суток после трансдукции соберите кондиционированную среду в 1.5 мл пробирку, центрифугируйте 5 минут при 1400 об/мин, 4 °С, перенесите надосадочную жидкость в новую 1.5 мл пробирку) внесите в 96-луночный планшет и добавьте 50 мкл рабочего раствора. Для бланкирования используйте 50 мкл воды вместо образца.

3. Инкубируйте в течение 1 часа при 37 °С.

4. Остановите реакцию добавлением 150 мкл 1 N NaOH (40 г NaOH, 1 л dH₂O).

5. Измерьте оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 515 нм.

6. Активность фермента рассчитывайте по следующей формуле:

$$\text{Единиц/мл} = \frac{(A_{515} \text{ Тест} - A_{515} \text{ Бланк}) \times (1) \times (0.25)}{(12.6) \times (0.05)}$$

Где:

1 – время инкубации (час);

0.25 – общий объем реакции (мл);

12.6 – коэффициент поглощения р.NCS при 515 нм;

0.10 – объем образца (мл).

В качестве примера на рисунке 16 показан анализ ферментативной активности ARSA в кондиционированной среде нативных и генетически модифицированных МСК. МКС были генетически модифицированы рекомбинантным AAV-ARSA. Генетическая модификация с помощью AAV-ARSA привела к значительному повышению ферментативной активности ARSA в клетках, по сравнению с нативными клетками и клетками, генетически модифицированными AAV-Katushka2S.

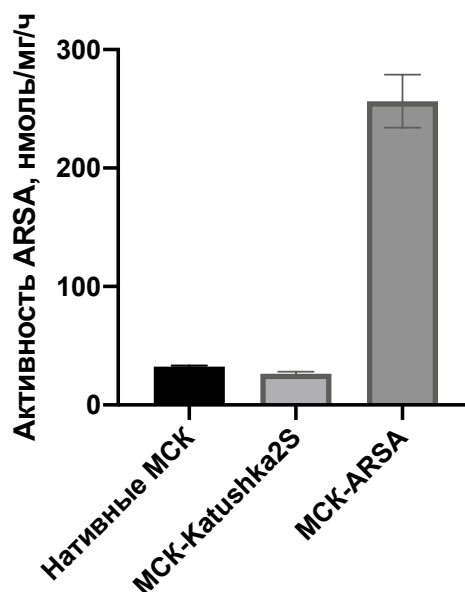


Рис. 16. Анализ ферментативной активности ARSA в кондиционированной среде генетически модифицированных МСК-ARSA. Нативные МСК – мезенхимные стволовые клетки без генетической модификации. МСК-Katushka2S – мезенхимные стволовые клетки, трансдуцированные AAV-Katushka2S. МСК-ARSA – мезенхимные стволовые клетки, трансдуцированные AAV-ARSA

2.8 Определение ферментативной активности HexA

Фермент HexA может гидролизовать синтетические субстраты, например, 4-метилумбеллиферил-GlcNAc-6-сульфат (англ. 4-methylumbelliferyl-GlcNAc-6-sulfate, 4MUGS). Это соединения используются в диагностике GM2-ганглиозидоза и определении носителей мутаций генов *HEXA* и *HEXB* [25].

1. Приготовьте растворы, указанные в таблицах 32–34.

Таблица 32

Цитратно-фосфатный буфер pH = 4.2

Компоненты	Количество
0.1 М Цитратной кислоты (0.96 г в 50 мл деионизированной воды)	29.4 мл
0.2 М Фосфата натрия (2.68 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в 50 мл деионизированной воды или 3.59 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ в 50 мл деионизированной воды)	20.6 мл

0.17 М Глицин-карбонатный буфер

Компоненты	Количество
Глицин	12.8 г
Карбонат натрия	18 г
dH ₂ O	200 мл

Растворите все реагенты в 150 мл воды, доведите pH до 10. Доведите объем до 200 мл.

3.2 mM Раствор флуоресцентного субстрата MUGS

Компоненты	Количество
4MUGS (Кат. №7-EQJ-32-3, TRC Canada)	1.592 мг
Цитратно-фосфатный буфер	1 мл

2. Образцы кондиционированной среды клеток (через 48 часов после трансфекции или 4–6 суток после трансдукции соберите кондиционированную среду в 1.5 мл пробирку, центрифугируйте 5 минут при 1400 об/мин, 4 °С, перенесите надосадочную жидкость в новую 1.5 мл пробирку) внесите в 96-луночный планшет по 60 мкл на лунку.

3. Добавьте субстрат по 25 мкл на лунку.

4. Инкубируйте планшет в течение 1 часа при 37 °С.

5. Остановите реакцию, добавив по 200 мкл глицин-карбонатного буфера в каждую лунку.

6. Измерьте флуоресценцию на спектрофотометре (возбуждение 365 нм, испускание 450 нм).

В качестве примера на рисунке 17 показан анализ ферментативной активности НехА в кондиционированной среде нативных и генетически модифицированных МСК. МКС были генетически модифицированы рекомбинантными AAV-HEXA и AAV-HEXB. Генетическая модификация с помощью рекомбинантных AAV привела к значительному повышению ферментативной активности НехА в клетках, по сравнению с нативными клетками и клетками, генетически модифицированными AAV-Katushka2S.

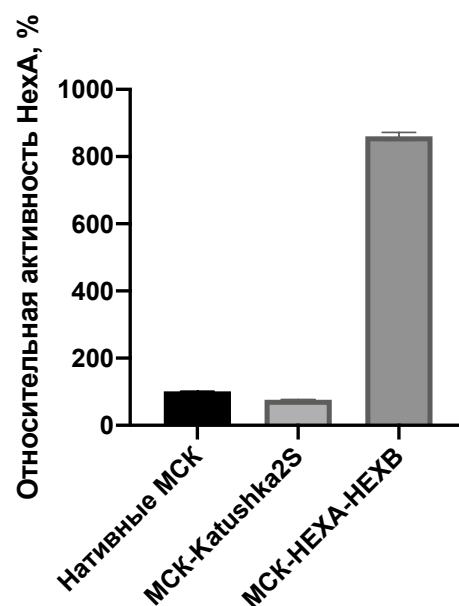


Рис. 17. Анализ ферментативной активности HexA в кондиционированной среде генетически модифицированных МСК-HEXA-HEXB. Нативные МСК – мезенхимные стволовые клетки без генетической модификации. МСК-Katushka2S – мезенхимные стволовые клетки, трансдуцированные AAV-Katushka2S. МСК-HEXA-HEXB – мезенхимные стволовые клетки, ко-трансдуцированные AAV-HEXA и AAV-HEXB

Литература

1. *Parenti G.* Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy / G. Parenti, G. Andria, A. Ballabio // *Annual Review of Medicine.* – 2015. – 66: p. 471-86.
2. *Schultz M.L.* Clarifying lysosomal storage diseases / M.L. Schultz, L. Tecedor, M. Chang et al. // *Trends in Neurosciences.* – 2011. – 34(8): p. 401-10.
3. *Daya S.* Gene therapy using adeno-associated virus vectors / S. Daya, K.I. Clin // *Microbiology Reviews.* – 2008. – 21(4): p. 583-93.
4. *Naso M.F.* Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy / M.F. Naso, B. Tomkowicz, W.L. Perry et al. // *BioDrugs.* – 2017. – 31(4): p. 317-334.
5. *Zolgensma* - one-time gene therapy for spinal muscular atrophy // *The medical letter on drugs and therapeutics.* – 2019. – 61(1577): p. 113-114.
6. *Prado D.A.* Gene therapy beyond luxturna: a new horizon of the treatment for inherited retinal disease / D.A. Prado, M. Acosta-Acero, R.S. Maldonado // *Current Opinion in Ophthalmology.* – 2020. – 31(3): p. 147-154.
7. *Keeler A.M.* Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? / A.M. Keeler, T.R. Flotte // *Annual Review of Virology.* – 2019. – 6(1): p. 601-621.
8. *Choi V.W.* AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery / V.W. Choi, D.M. McCarty, R.J. Samulski // *Current Gene Therapy.* – 2005. – 5(3): p. 299-310.
9. *Wang D.* Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery / D. Wang, P.W.L. Tai, G. Gao // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2019. – 18(5): p. 358-378.
10. *Naso M.F.* Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy / M.F. Naso, B. Tomkowicz, W.L. Perry et al. // *BioDrugs.* – 2017. – 31(4): p. 317-334.
11. *Davidson B.L.* Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system / B.L. Davidson, C.S. Stein, J.A. Heth et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – 97(7): p. 3428-32.
12. *Gao G.P.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy / G-P Gao, M.R. Alvira, L.

Wang, R. Calcedo // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – 99(18): p. 11854-9.

13. *Chao H.* Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors / H. Chao, Y. Liu, J. Rabinowitz et al. // Molecular Therapy. – 2000. – 2(6): p. 619-23.

14. *Blankinship M.J.* Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6 / M.J. Blankinship, P. Gregorevic, J. M. Allen et al. // Molecular Therapy. – 2004. – 10(4): p. 671-8.

15. *Nachbar F.* Orificial tuberculosis: detection by polymerase chain reaction / F. Nachbar, V. Classen, T. Nachbar et al. // British Journal of Dermatolog. – 1996. – 135(1): p. 106-9.

16. *Crosson S.M.* Helper-free Production of Laboratory Grade AAV and Purification by Iodixanol Density Gradient Centrifugation / S.M. Crosson, P. Dib, J.K. Smith et al. // Molecular Therapy: Methods & Clinical Development. – 2018. – 10: p. 1-7.

17. *Aurnhammer C.* Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences / C. Aurnhammer, M. Haase, N. Muether et al. // Human Gene Therapy Methods. – 2012. – 23(1): p. 18-28.

18. *Martinez-Fernandez de la Camara C.* Accurate Quantification of AAV Vector Genomes by Quantitative PCR / C. Martinez-Fernandez de la Camara, M.E. McClements, R.E. MacLaren // Genes (Basel). – 2021. – 12(4).

19. *Berry G.E.* Cellular transduction mechanisms of adeno-associated viral vectors / G.E. Berry, A. Asokan // Current Opinion in Virology. – 2016. – 21: p. 54-60.

20. *Crick, F.* Central dogma of molecular biology / F. Crick // Nature. – 1970. – 227(5258): p. 561-3.

21. *Temin H.M.* RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus / H.M. Temin, S. Mizutani // Nature. – 1970. – 226(5252): p. 1211-3.

22. *Jung U.* A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA / U. Jung, X. Jiang, S. H. E. Kaufmann et al. // RNA. – 2013. – 19(12): p. 1864-73.

23. *Lukatela, G.* Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel

mechanism for sulfate ester hydrolysis / G. Lukatela, N. Krauss, K. Theis et al. // *Biochemistry*. – 1998. – 37(11): p. 3654-64.

24. *Lee-Vaupel M.* A simple chromogenic assay for arylsulfatase A / M. Lee-Vaupel, E. Conzelmann // *Clinica Chimica Acta*. – 1987. – 164(2): p. 171-80.

25. *Cachon-Gonzalez M.B.* Gene transfer corrects acute GM2 gangliosidosis--potential therapeutic contribution of perivascular enzyme flow / M.B. Cachón-González, S.Z. Wang, R. McNair, Josephine Bradley // *Mol Ther*. – 2012. – 20(8): p. 1489-500.