

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования

**«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_  
подпись инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Получение и анализ геномных вариантов генов изоформ люциферазы  
*Metridia longa* для создания стабильных репортерных клеточных линий

Руководитель

\_\_\_\_\_ с.н.с., канд. биол. наук С.В. Маркова  
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Студент

\_\_\_\_\_ М.О. Вяткина  
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2022

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Получение и анализ геномных вариантов генов изоформ люциферазы *Metridia longa* для создания стабильных репортерных клеточных» содержит 38 страницы текстового документа, 17 иллюстраций, 3 таблицы, 26 использованных источников.

ИЗОФОРМЫ ЛЮЦИФЕРАЗЫ METRIDIA, кДНК ГЕНЫ, ГЕНОМНЫЕ ГЕНЫ, *METRIDIA LONGA*.

Целью работы было определить геномную структуру и организацию люциферазных генов, в том числе подтвердить наличие многих паралогичных (неаллельных) генов, обеспечивающих яркое свечение рачков *Metridia longa*, а также поиск потенциально лучших вариантов генов люциферазы для использования в качестве генетически-кодируемых репортеров при создании постоянных клеточных линий. В задачи исследования входило: 1) Выделение геномной ДНК из замороженных рачков *Metridia longa*. 2) Подбор оптимальных условий для синтеза геномных и кДНК вариантов генов изоформ люциферазы *Metridia*. 3) Клонирование геномной и кДНК генов изоформ люциферазы *Metridia longa* методом амплификации генов на матрицах геномной ДНК, ранее выделенной из замороженных рачков, и тотальной кДНК. 4) Анализ и сравнение полученных сиквенсов с целью идентификации структуры и геномной организации люциферазных генов. 5) Создание конструкций с геномным и кДНК генами *MLuc7* для сравнения репортерных свойств геномного и кДНК вариантов в клетках млекопитающих.

Для дальнейшего понимания возникновения и эволюции билюминесценции копепод *M. longa* требуется информация об обеспечивающих ее геномных последовательностях. Идентификация и анализ последовательностей интронов, которые подвержены гораздо большему эволюционному изменению, поскольку не испытывают сильного давления естественного отбора для сохранения билюминесцентной функции белка, может дать существенные аргументы для точной идентификации групп паралогичных генов и прояснить генетическую основу и пути эволюции билюминесцентной функции копепод. Кроме того, природные варианты геномных генов могут оказаться лучшим вариантом для эукариотической экспрессии при использовании люциферазы в качестве генетически-кодируемого репортера, например, в клетках млекопитающих, а также обеспечить большую стабильность получаемых репортерных клеточных линий.

В результате удалось выделить 12 кДНК и 4 генДНК клонов для *MLuc2* изоформы и 15 кДНК и 10 генДНК клонов для *MLuc7* изоформы. Было установлено, что *MLuc2* изоформа имеет 4 интрона, а *MLuc7* изоформа – 3. что указывает на то, что данные изоформы являются неаллельными паралогичными генами. *MLuc 2* и *MLuc7* изоформы имеют одинаково расположенный интрон в середине высококонсервативного мотива повторяющейся последовательности, что говорит о том, что данный интрон уже был в предковой последовательности до образования люциферазного гена путем тандемного повтора. Также с одними из клонированных кДНК и генДНК клонов *MLuc7* изоформы были соз-

даны конструкции на основе экспрессионного эукариотического вектора pсDNA3.1+.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ .....	2
Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.2 Ареал обитания, жизненный цикл и биолюминесцентная функция копепод <i>Metridia longa</i> .....	7
1.2 Клонирование и характеристика последовательностей изоформ люциферазы <i>Metridia longa</i> .....	8
1.3 Практическое применение люциферазы <i>Metridia</i> в качестве репортерного белка.....	10
1.4 Мультигенные семейства в геномах как гарантия обеспечения надежности функции белка.....	11
Глава 2. Материалы и методы .....	14
2.1. Материалы .....	14
2.2 Методы.....	15
Глава 3. Результаты эксперимента и обсуждение .....	22
Выводы.....	35
Список сокращений .....	36
Список используемых источников.....	37

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время секретируемую люциферазу из копепод *Metridia longa* стали широко применять в качестве высокочувствительного биолюминесцентного репортера в различных исследованиях *in vivo* и *in vitro*. Ее активное использование обусловлено привлекательными свойствами белка, такими как: небольшой размер, простая кофактор-независимая реакция, требующая лишь наличия субстрата целентразина и молекулярного кислорода, высокая биолюминесцентная активность, линейная зависимость величины светового сигнала люциферазы и ее концентрации, высокая термостабильность и не токсичность для клеток [1].

Люциферазу *Metridia* условно можно разделить на три части: отщепляемый сигнальный пептид, вариабельный N-конец и C-концевую консервативную часть. Консервативная C-концевая часть в свою очередь состоит из двух неидентичных тандемных повторов длиной около 70 аминокислотных остатков, каждый из которых включает в себя высоко консервативный мотив из 32 аминокислот [2].

Ранее для люциферазы *M. longa* функциональным скринингом было идентифицировано одиннадцать кДНК генов, кодирующих различные изоформы. Анализ последовательностей выявил четыре группы изоформ с межгрупповой идентичностью от 83 до 54% [3]. Такие существенные различия в кДНК последовательностях предполагают, что данные изоформы люциферазы *M. longa* являются продуктами неаллельных генов. Это означает, что биолюминесцентная функция копепода *M. longa* поддерживается по меньшей мере четырьмя парами паралогичных генов, которые развились независимо от одного и того же родительского гена после многократных дупликаций в геноме предкового светящегося копепода [1].

Дальнейшее понимание возникновения и эволюции биолюминесценции копепод *M. longa* требует знания об обеспечивающих ее геномных последовательностях. Идентификация и анализ последовательностей интронов, которые подвержены гораздо большим эволюционным изменениям, поскольку не испытывают сильного давления естественного отбора для сохранения биолюминесцентной функции белка, может дать существенные аргументы для точной идентификации групп паралогичных генов и прояснить генетическую основу и пути эволюции биолюминесцентной функции копепод. Кроме того, природные варианты геномных генов могут оказаться лучшим вариантом для эукариотической экспрессии при использовании люциферазы в качестве генетически-кодируемого репортера, например, в клетках млекопитающих, а также обеспечить большую стабильность получаемых репортерных клеточных линий.

Цель данной работы – определить геномную структуру и организацию люциферазных генов, в том числе подтвердить наличие многих паралогичных (неаллельных) генов, обеспечивающих яркое свечение этих рачков *Metridia*, а также поиск потенциально лучших вариантов генов люциферазы для использования в качестве генетически-кодируемых репортеров при создании постоянных клеточных линий.

На данном этапе исследований в задачу работы входило:

- выделение геномной ДНК из замороженных рачков *Metridia longa*;
- подбор оптимальных условий для синтеза геномных и кДНК вариантов генов изоформ люциферазы *Metridia*;
- клонирование геномной и кДНК генов изоформ люциферазы *Metridia longa* методом амплификации генов на матрицах геномной ДНК, ранее выделенной из замороженных рачков, и тотальной кДНК;
- анализ и сравнение полученных сиквенсов с целью идентификации структуры и геномной организации люциферазных генов;
- создание конструкций с геномным и кДНК генами *MLuc7* для сравнения репортерных свойств геномного и кДНК вариантов в клетках млекопитающих.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.2 Ареал обитания, жизненный цикл и биолюминесцентная функция копепод *Metridia longa*

*Metridia longa* – маленький (~1,5 мм) светящийся морской копепод, который был классифицирован как арктический глубоководный вид, основное распространение которого приходится на северную часть Северной Атлантики и Арктику. Сообщается также о нахождении данного вида в более глубоких водах южной части Северной Атлантики [4]. Формы *M. longa* составляют значительную часть зоопланктона в холодных водах и являются потенциальной добычей для пелагических хищников. Это один из доминирующих зоопланктонных организмов в Балсфьорде, на севере Норвегии, как по численности, так и по биомассе. Вместе с *Calanus finmarchicus* на их долю приходится около 40-50% среднегодовой биомассы зоопланктона [5].

Цикл генерации каланоидных копепод тесно связан с их трофическим положением. В отношении вида *M. longa* была некоторая дискуссия относительно питания, и он был по-разному классифицирован, как преимущественно травоядный, всеядный или преимущественно хищник [5]. Однако все предположения оказались так или иначе верными, так как *M. longa* действительно в преимуществе питается фитопланктоном, когда он в изобилии, но иногда может потреблять и другую пищу, например, такую как микрозоопланктон [6].

Виды, которые в преимуществе являются травоядными, имеют время нереста, а, следовательно, и развитие их молодняка, совпадающее с периодами высокой продукции фитопланктона. Исследование зоопланктонного сообщества Балсфьордена, Северная Норвегия [7] показало, что *M. longa* имеет свой пик нереста через 2-3 недели после *Calanus finmarchicus*, у которых нерест идет во время весеннего цветения. Это дополнительно подтверждается исследованиями развития гонад, демонстрирующее, что большинство взрослых самок *M. longa* имели зрелые яичники с апреля по май. Исследования от других, более южных регионов, предполагали, что *M. longa* есть два периода размножения, один весной, а другой осенью [8], однако при исследовании его жизненного цикла в Балсфьорде, нет сомнения, что у *M. longa* лишь 1 период размножения – летний. Также данное исследование показало, что основная часть молодых особей копепод, появившиеся в начале июня, развиваются в очевидной последовательности в течение лета, а переход во взрослую особь происходит в период осени с самцами, имеющими более высокую скорость развития, чем у самок, появляющихся первыми [7].

Большинство известных светящихся видов каланоидных копепод относится к надсемейству *Augaptiloidea*, которое включает семейства *Arietellidae*, *Augaptilidae*, *Heterorhabdidae*, *Lucicutiidae*, *Metridinidae* и *Nullosetigeridae* [9]. Для *M. longa*, как и для других представителя семейства *Metridinidae*, характерно явление биолюминесценции. Яркая синяя люминесценция возникает как секреция из эпидермальных желез, расположенных в головной части и брюшной полости в ответ на механические, электрические или химические воздейст-

вия [3]. При тревоге это маленькое ракообразное (обычно длиной 0,5-2 мм) выпускает в морскую воду яркую светящуюся жидкую “бомбу”, которая, скорее всего, ослепляет потенциальных хищников, адаптированных к темноте, и обеспечивает светящуюся завесу в качестве прикрытия для побега копепода. Биolumинесцентная реакция показывает кинетику типа «вспышки» (Рис. 1), где световое излучение быстро затухает со временем [1].

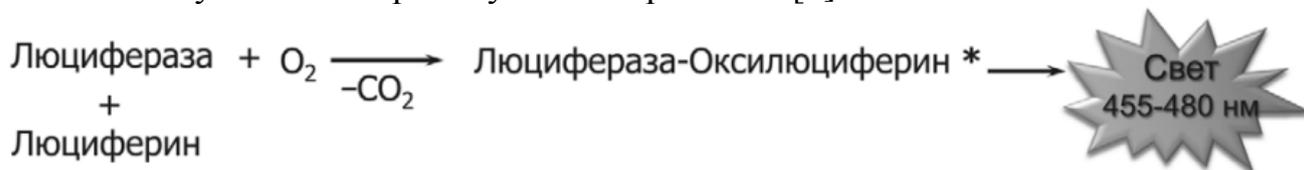


Рисунок 1 – Общая схема биolumинесцентной реакции люциферазного типа [2]

## 1.2 Клонирование и характеристика последовательностей изоформ люциферазы *Metridia longa*

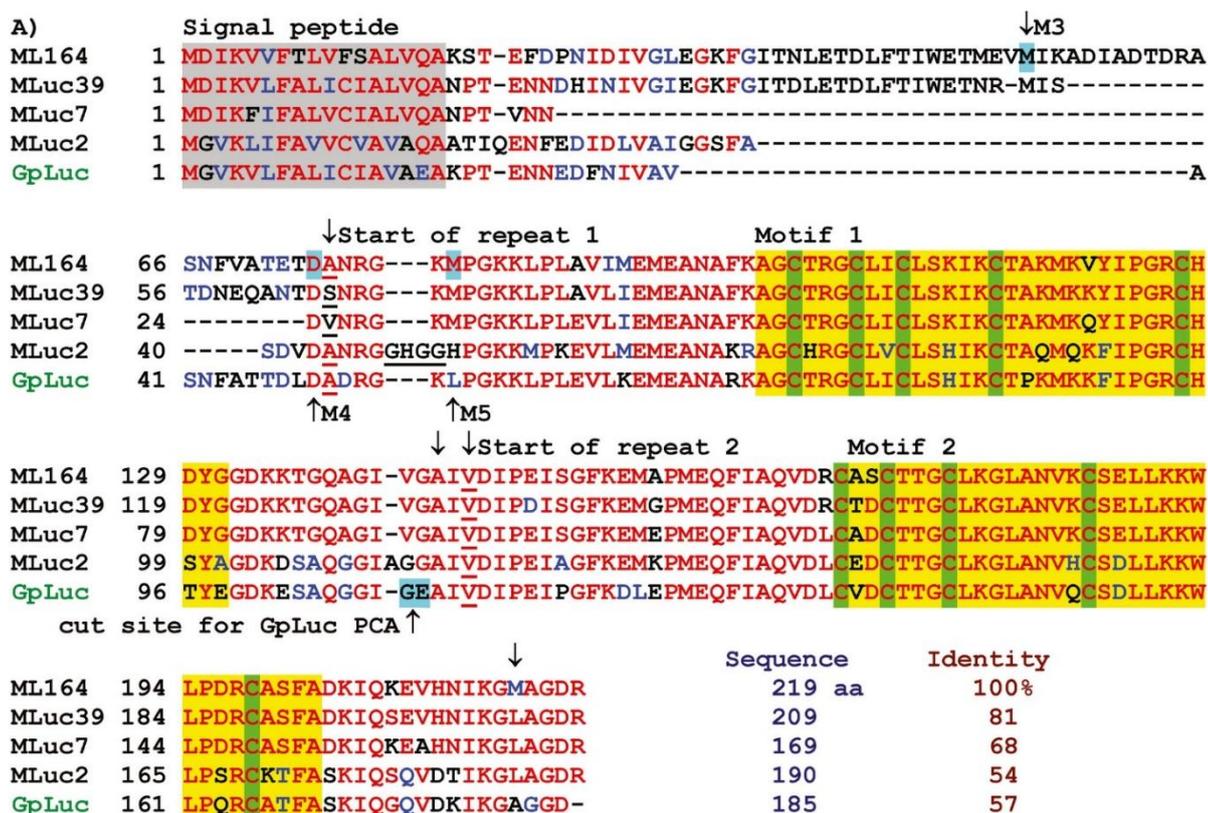
В ранних исследованиях уже сообщалось о биolumинесцентных организмах с природными секретируемыми люциферазами и о клонировании кДНК, кодирующие некоторые из этих люцифераз. Среди которых морской остракод *Vargula hilgendorfii* [10], глубоководные креветки *Oplophorus gracilorostris* [11] и морской копепод *Gaussia princeps* [12]. О клонировании люциферазы *Metridia* (MLuc) сообщалось в исследовании [3], низкая молекулярная масса, которой (23,9 кДа) является преимуществом перед другими люциферазами, например, люциферазой *Vargula*, при использовании люцифераз в качестве биolumинесцентных репортеров в различных аналитических приложениях. Позднее было сообщено о клонировании гена кДНК, кодирующего новую секретируемую неаллельную 16,5-кДа люциферазу (MLuc7) *M. longa*, которая, по сути, является самой маленькой природной люциферазой из известных на сегодняшний день [13].

Аминокислотная последовательность изоформы MLuc7 включает 169 аминокислотных остатков и проявляет достаточно высокую степень гомологии с остальными копеподными люциферазами. N-концевая часть зрелого фермента MLuc7 является короткой и близкой по размеру с ранее описанными высокоактивными делетированными вариантами MLuc164. Как и остальные изоформы, MLuc7 представляет собой цистеин-богатый белок, несущий в консервативной части 10 цистеиновых остатков. Ранее экспериментально было показано, что восстановительные условия приводят к полной потере активности фермента. Из этого следует, что нативная люцифераза содержит дисульфидные связи, необходимые для функционирования биolumинесцентного белка [14].

Другая изоформа MLuc2 (18,5 кДа) явно представляет другую паралогичную группу, поскольку различается с последовательностями 3-х других изоформ люциферазы *M. longa*, выявляя 70% идентичности. Анализ аминокислотных гомологий выявил, что изоформа MLuc2 имеет большее сходство с люциферазами *M. pacifica* и *M. okhotensis* (идентичность до 91%). Кроме этого, изоформа MLuc2 проявляет различия в строении структуры повторов, находящихся

ся в консервативной области люцифераз. MLuc2 имеет укороченные консенсусные последовательности по сравнению с остальными описанными люциферазами *Metridia* и меньшую степень идентичности между повторами [15].

Множественное выравнивание последовательностей люцифераз копепод показало, что условно люциферазу *Metridia* можно разделить на три части: отщепляемый сигнальный пептид, варибельный N-конец и С-концевую консервативную часть (Рис. 2). Консервативная С-концевая часть, в свою очередь, состоит из двух неидентичных тандемных повторов длиной около 70 аминокислотных остатков, каждый из которых включает в себя высококонсервативный мотив из 32 аминокислот [2].



B) MLuc7: 69-aa tandem repeats share ~26% of identity (~44% similarity); 32-aa highly conservative motifs share ~41% of identity (~66% similarity)

ML7-R1	25-VNRGKMPGKKLPLEVLIEMEANAFKAGCTRGCLICLSKIKCTAKMKQYIPGRCHDYGGDKKTGQAGIVG-93
ML7-R2	96-VDIPEISGFKEMEPMEQFIAQVDLCADCTTGCLKGLANVKSELLKKWLPDRCASFADKIQKEAHNIK-165
	*. . * * . . * * * * * * . * . * * * * . . * * * * * *

Рисунок 2 – Множественное выравнивание изоформ люциферазы *Metridia longa*: MLuc164, MLuc39, MLuc7 и MLuc2 [1]

красный цвет – идентичные а.о., синий - а.о. имеющие сходные свойства, черточки - пробелы, серый - сигнальные пептиды, обеспечивающие секрецию люцифераз, желтый - высоко консервативные мотивы внутри неидентичных повторов

Варибельная N-концевая часть существенно не влияет на билюминесцентную функцию люциферазы, так как ее длина падает до шести аминокислот в изоформе MLuc7 из *Metridia longa*. Кроме того, постепенное усечение N-

терминальной вариабельной части другой изоформы *M. longa*, самой длинной MLuc164, до 15,1 кДа (M5 на фиг. 2 А) приводит даже к увеличению эффективности биолюминесцентной реакции [16].

Анализ одиннадцати идентифицированных кДНК генов, кодирующих различные изоформы, выявил четыре группы изоформ с межгрупповой идентичностью от 83 до 54% [3]. Такие существенные различия в кДНК последовательностях предполагают, что данные изоформы люциферазы *M. longa* являются продуктами неаллельных генов. Это означает, что биолюминесцентная функция копепода *M. longa* поддерживается по меньшей мере четырьмя парами паралогичных генов, которые развились независимо от одного и того же родительского гена после многократных дупликаций в геноме предкового светящегося копепода [1].

### 1.3 Практическое применение люциферазы *Metridia* в качестве репортерного белка

В настоящее время секретируемые люциферазы копепод *Metridia longa* стали широко применяться в качестве высокочувствительных репортеров в различных исследованиях *in vivo* и *in vitro*. Секретируемые репортеры являются удобным аналитическим инструментом, так как обеспечивают возможность многократного наблюдения внутриклеточных процессов *in vivo* в реальном времени без разрушения клеток и тканей [17].

Активное использование люциферазы копепод *Metridia longa* в качестве эффективных аналитических инструментов обусловлено их привлекательными свойствами, такими как:

1) относительно небольшой размер: изоформа MLuc2 имеет размер в районе 18,5 кДа [14], а изоформа MLuc7 является самой маленькой, из всех известных, на сегодняшний день природных люцифераз – 16,5 кДа [3];

2) простая кофактор-независимая реакция, требующая лишь наличия субстрата целентеразина и молекулярного кислорода [13];

3) высокая биолюминесцентная активность [2];

4) широкий линейный диапазон зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации белка, который составляет примерно около шести порядков, с нижним пределом обнаружения до ~ 1 фмоль;

5) линейная корреляция величины светового сигнала люциферазы и ее концентрации [1];

5) экстремально высокая термостабильность, активность люциферазы сохраняется даже при нагреве до 100°C [1];

б) нетоксичность для клеток;

К основным исследованиям по применению люциферазы MLuc в качестве биолюминесцентных репортеров относятся иммунологические анализы, технологии высокопроизводительного скрининга, анализ комплементации белковых фрагментов (РСА) и *in vivo* не инвазивная биолюминесцентная визуализация (Рис. 3) [1].

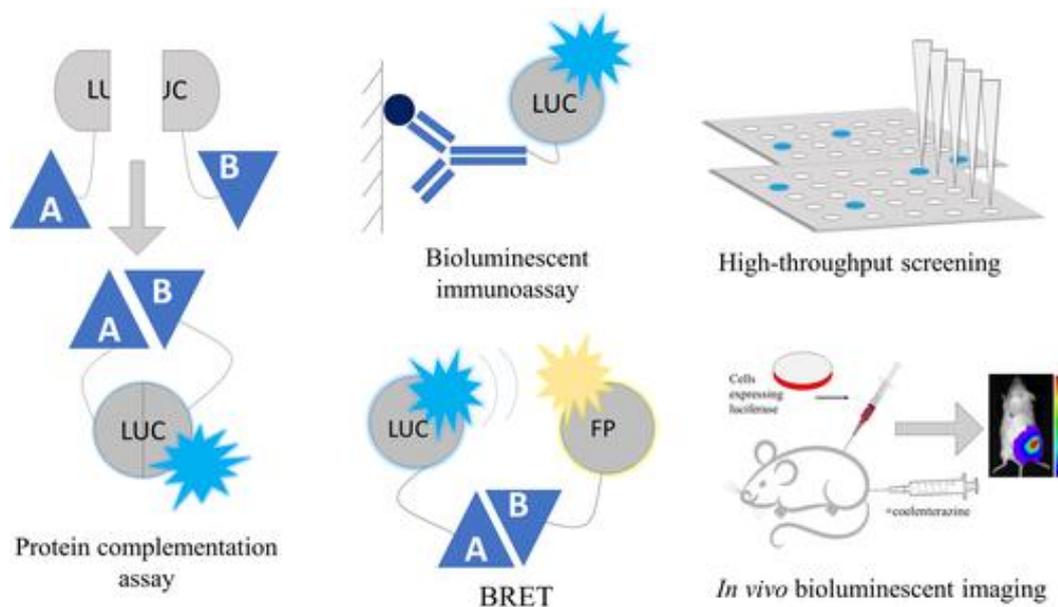


Рисунок 3 – Основные области применения люциферазы MLuc в качестве биолуминесцентного репортера [1]

Использование биолуминесцентных белков в качестве меток обеспечивает высокую чувствительность обнаружения аналита в различных анализах связывания, что широко применяется в иммуноанализах. А благодаря *in vivo* визуализации с использованием биолуминесцентных белков, стало возможно неинвазивным и нетоксичным способом мониторить процессы в интактных клетках и моделях мелких животных [18].

С применением биоаналитических систем на основе биолуминесцентного резонансного переноса энергии (BRET), полученных на основе люцифераз, стало возможным значительно улучшить глубокую тканевую оптическую визуализацию *in vivo* благодаря лучшему проникновению длинноволнового света [18]. А технологии высокопроизводительного скрининга (HTS) стали основным методом получения различных лекарственных препаратов и исследования множественных взаимодействий клеточных белков [1]. Также, большое количество исследований, связанных с белок-белковыми взаимодействиями, в настоящее время проводится методом PCA (Protein-fragment complementation assay) – комплементации фрагментов репортера [18,20].

Однако, применение люциферазы *Metridia longa* в качестве генетически кодируемого секретируемого репортера для неразрушающего анализа экспрессии различных генов и работы промоторов, особенно в форматах высокопоточного скрининга, является наиболее популярным [1].

#### 1.4 Мультигенные семейства в геномах как гарантия обеспечения надежности функции белка

Мультигенные семейства – это группа генов, которые произошли от общего предкового гена и поэтому имеют сходные функции и сходные последовательности. Группу родственных мультигенных семейств иногда называют

суперсемейством [21]. Суперсемейства могут выполнять разные функции, но содержат домен общего происхождения [22]. Семейства могут отличаться по степени родства между составляющими их генами. Некоторые состоят из множества идентичных представителей, а некоторые включают членов, связанных очень дальним родством. Обычно гены схожи последовательностями экзонов и отличаются интронами. Тесно связанные по своей структуре члены семейства обычно выполняют сходные (или даже идентичные) функции, хотя они могут экспрессироваться в разное время или в разных типах клеток [23].

Семейства генов в основном возникают за счет двух механизмов дупликации генов: неравного кроссинговера и ретропозиции. Первый механизм обычно создает тандемные повторы, физически связанные на хромосомах, и, следовательно, неслучайным образом. Члены семейства в этом случае могут иметь интроны (если исходный ген имел интроны) и некодирующие регуляторные последовательности. Ретропозиция, напротив, приводит к вставке безинтронной кДНК с потерями некодирующих областей, более или менее случайным образом, в местах, рассеянных по геному [24].

Мультигенные семейства могут быть организованы в геноме по-разному (Рис.4). Сгруппированные гены обычно образуют мультигенные семейства с перекрывающимися функциями, тогда как рассеянные могут становиться более разнообразными по выполняемым ими функциям [22].

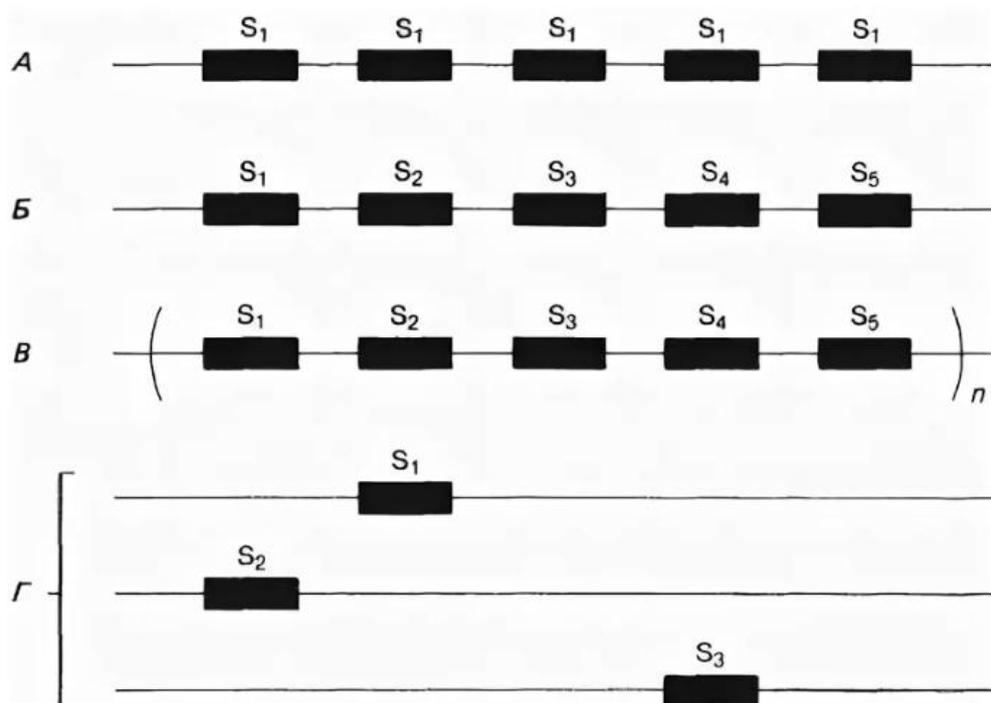


Рисунок 4 – Типы организации мультигенных семейств [25]. А – идентичные гены, сцепленные тандемно, Б – близкие, но не идентичные гены, сцепленные тандемно, В – скопления неидентичных генов, сцепленных тандемно, Г – близкие гены, рассеянные по нескольким хромосомам

Мультигенные семейства необходимы для двух целей. Первое, когда организму требуется большое количество идентичного белка, то достигается функциональное единообразие генов. Второе, когда требуется синтезировать белок, более соответствующий изменяющимся условиям среды, то необходимы копии гомологичных генов с различающимися условиями проявления активности [26].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

В работе по анализу геномных генов изоформ люциферазы *Metridia longa* использовались следующие материалы:

Замороженные рачки *Metridia longa*, собранные на Белом море, 1999 г.;

Набор DU для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови («Биолабмикс», Новосибирск);

Краситель GelGreen, 10.000X раствор в ДМСО («Biotium», США)

Набор QIAquick Gel Extraction Kit для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей («QIAGEN», Германия);

Штамм *E. coli* XL1-Blue;

Кюветы для электропорации фирмы Bio-Rad;

Набор QIAprep Spin Miniprep Kit для выделения плазмидной ДНК («QIAGEN», Германия);

Набор QIAquick PCR Purification kit для очистки ПЦР-фрагментов («QIAGEN», Германия);

Таблица 1 – Используемые в работе олигонуклеотиды

№	Последовательность (5'→3')
	Для синтеза ДНК MLuc2 изоформы
844	ATTCAGAAAAC TGAGTCCAAAC
845	CAGTTAACACTTTTTTATTTGC
	Для синтеза ДНК MLuc7 изоформы
846	ATTCAGTCAACTGGATCCAA
847	AATACATAGAATATATTTATAGGAA
	Для быстрого скрининга вставок ДНК в плазмиде pAL2-T
	Для скрининга MLuc2 изоформы
T2pro	TAATACCACTCACTATAGGG
M13R	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	Для скрининга MLuc7 изоформы
897	GGAAGATGTCATGATTATGG
847	AATACATAGAATATATTTATAGGAA

Буфер для электрофореза – TAEх50 with EtBr (2М Трис, 50мМ ЭДТА, 1М уксусной кислоты);

Краситель для электрофореза – DNA Gel Loading Dye 6X (10 mM Трис-НСl, 0,03% бромфеноловый синий, 0,03% ксиленцианол FF, 60% глицерин, 60 mM ЭДТА);

Агароза, легкоплавкая агароза («Bio-Rad»);

Маркеры молекулярного веса «1 kb DNA Ladder» NEB и «100 bp Ladder» SibEnzyme.

## 2.2 Методы

### 2.2.1 Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК проводили из нескольких рачков (~20 mg) *M. longa* набором DU-10 для выделения геномной ДНК из клеток и тканей («Био-лабмикс», Новосибирск). Копеподы *M. longa* были собраны на Белом море в 1999 г. и хранились замороженными при -80°C. Гомогенизировали образец в 600 мкл буфера для лизиса LB в стеклянном гомогенизаторе. Инкубировали в течение 10 минут при температуре 15-25 °С. Далее центрифугировали клеточный лизат в течение 30 с, 1000 gcf и переносили супернатант в чистую пробирку. К лизату добавили 200 мкл 96% этанола (1/3) и перемешивали пипетированием. Перенесли смесь на колонку и центрифугировали в течение 30 с 10000 gcf. Удалили фильтрат. Нанесли на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировали в течение 30 с 10000 gcf, удалили фильтрат. Нанесли на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировали в течение 30 с 10000 gcf, удалили фильтрат. Центрифугировали колонку 3 мин 10000 gcf, для удаления остатков WB2. Перенесли колонку в новую 1,5 мл пробирку и подсушили ее 5 мин. Нанесли в центр фильтра колонки 40 мкл буфера для элюции (10 mM Tris-НСl pH 8.0, 1 mM EDTA) и инкубировали 3 мин, центрифугировали 2 мин 10000 gcf.

### 2.2.2 Синтез геномных и кДНК генов изоформ люциферазы *Metridia*

Синтез геномных и кДНК генов проводили методом ПЦР по схеме раздельного синтеза для MLuc7 изоформы, и обычной ПЦР для MLuc2, в термоциклерах «C1000-Touch» Bio-Rad и «PTC-200» MJReserch.

Для синтеза MLuc2 изоформы смешивали реакционный буфер, на общий объем которого (25мкл) входили следующие компоненты:

2.5 мкл 10X Encyclo buff;

0.5мкл 10 mM dNTP;

1,5 мкл 10 μM 5'-844;

1.5 мкл 10 μM 3'-845;

1 мкл Encyclo polymerase;

18мкл H<sub>2</sub>O;

Далее в смесь добавляли 1 мкл генДНК или кДНК матрицы.

Параметры ПЦР реакции:

95°C – 2 мин  
 95°C – 20 сек  
 58°C – 30 сек  
 72°C – 1.5 мин  
 72°C – 5 мин

} 39 циклов (всего 40)

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 58°C – температура отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК.

Для синтеза MLuc7 изоформы смешивали реакционный буфер, в который входили следующие компоненты:

78 мкл H<sub>2</sub>O;  
 10 мкл X10 Encycl buff;  
 2 мкл 10mM dNTP;  
 4 мкл Encyclo polymerase;

Далее реакционный буфер делили на 2 пробирки по 47 мкл. В одну добавляли 3 мкл 10μM 5'– праймера 846, в другую 3 мкл 10 μM 3'– праймера 847. Потом делили каждую пробирку еще по 25 мкл. В первую и третью пробирки добавляли 1 мкл геномной ДНК матрицы, во вторую и четвертую – 1 мкл кДНК матрицы.

Далее первую и вторую пробирки ставили при температуре отжига 59°C, третью и четвертую – при 55.5°C на 19 циклов. После первого ПЦР добавляли недостающий праймер в каждую пробирку по 1.5 мкл. И все пробирки ставили при низшей температуре отжига – 55.5°C еще на 19 циклов для кДНК и 35 циклов для геномной ДНК

Параметры ПЦР реакции:

95°C – 2 мин  
 95°C – 20 сек  
 59°C для 846 и 55.5°C для 847 – 30 сек  
 72°C – 1.5 мин  
 72°C – 5 мин

} 19 цикла (всего 20)

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 59°C и 55.5°C – температуры отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК.

### 2.2.3 Выделение ДНК из агарозного геля

Синтезированные фрагменты разделяли препаративным электрофорезом и выделяли из геля агарозы после окрашивания красителем GelGreen. Для окрашивания краситель GelGreen разбавляли водой в 3000 раз. После чего, в раствор помещали целый гель и окрашивали 30 минут. Далее на трансиллюминаторе с голубым светом «Safe imager» Invitrogen вырезали все фрагменты.

Из агарозного геля фрагменты выделяли набором QIAquick Gel Extraction Kit для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей ("QIAGEN", Германия). Сначала в пробирку с гелем добавили два объема QG буфера к 1 объему геля (100мг~10мкл), растворили гель. Добавили 1 объем изопропанола и перемешали. Вносили по 100-500 мкл раствора на колонку, центрифугирова-

ли 1 мин. при 14000 rpm. Повторяли пока не израсходовали весь объем смеси. Добавили 500 мкл QG буфера на колонку, центрифугировали при тех же условиях. Для промывки, добавили PE буфер сначала 500 мкл, инкубировали 5 минут и центрифугировали при тех же условиях. Далее добавили 250 мкл PE буфера, инкубировали 5 минут и центрифугировали 3 мин. при 14000 rpm. Колонки переместили в стерильные 1.5 мл пробирки и сушили 10 минут. В центр мембраны колонки добавили 30 мкл EB буфера, инкубировали 5 минут. Центрифугировали 1 мин. при 14000 rpm.

#### **2.2.4 Лигирование**

Лигирование генДНК и кДНК фрагментов изоформ люциферазы в векторе pAL2-T (Евроген, Россия) в 10 мкл проводили в термоциклере «PТС-200» MJResearch. Для этого приготовили реакционную смесь. В смесь на один образец входят:

- 1.0 мкл X10 Lig buff;
- 1.0 мкл DNA Ligase;
- 1.0 мкл pAL2-T вектор.

Объем генДНК и кДНК рассчитывался в зависимости от концентрации выделенных фрагментов. Соотношение концентрации вектора и фрагментов должно быть примерно 1:1. Недостающий объем восполняли H<sub>2</sub>O. Реакция проходит всю ночь при 14°C.

Лигирование конструкций с геномной ДНК и кДНК MLuc7 в экспрессионном эукариотическом векторе pсDNA3.1+ в 10 мкл проводили на том же термоциклере. Для этого приготовили реакционную смесь:

- 1.0 мкл X10 Lig buff;
- 1.0 мкл pсDNA3.1+ вектор;
- 1.0 мкл DNA Ligase.

Объем генДНК и кДНК рассчитывался в зависимости от концентрации синтезированных фрагментов. Соотношение концентрации в моля вектора и фрагментов должно быть 1:4. Недостающий объем восполняли H<sub>2</sub>O. Реакция проходила всю ночь при 16°C.

Перед трансформацией в бактерии лигазы инактивировали нагреванием до 64°C и инкубацией при этой температуре в течение 10 минут.

#### **2.2.5 Приготовление электрокомпетентных клеток**

Засеяли 1 мл свежей культуры клеток XL1-Blue в 100 мл среды SOB. Инкубацию проводили в литровой колбе при 37°C энергично встряхивая. Через три часа измерили OD<sub>600</sub>. Остановили культивирование, когда OD достигла 0,7-0,8. Охладили клетки в течение 20 минут во льду. Предварительно охладили центрифугу до 4°C и поставили в лед 10% глицерольную воду. Разлили клетки в две 50 мл пробирки и центрифугировали при 4500 rpm 10 минут. Слили супернатант и ресуспендировали клетки в 35-40 мл глицерольной воды, центри-

фугировали при 3800 rpm 10 минут. Ресуспендировали клетки в 10 мл глицерольной воды и перенесли клетки в одну 50 мл пробирку. Центрифугировали при 3800 rpm 10 минут. Ресуспендировали клетки в 20 мл глицерольной воды, центрифугировали при тех же условиях. Ресуспендировали клетки в 6 мл глицерольной воды, центрифугировали при тех же условиях. Окончательно ресуспендировали клетки в 400 мкл глицерольной воды и разлили клетки в чистые пробирки по 160 мкл.

### **2.2.6 Трансформация клеток *E. coli* электропорацией**

В отдельные пробирки добавляли по 80 мкл клеток XL1-Blue и по 2 мкл диализованной лигазной геномной ДНК и кДНК изоформ люциферазы. Кюветы для электропорации предварительно охладили во льду. Во льду добавили в кювету клетки с ДНК. На пульсере установили 1800 кВ для 100 мкл кюветы, сделали пульс. Немедленно добавили 2 мл SOC и перенесли все в 15 мл стерильную пробирку. Восстанавливали клетки при 30°C 2 часа при 150 rpm.

### **2.2.7 Трансформация клеток *E. coli* тепловым шоком**

В 60 мкл химических клеток XL1-Blue добавляли 6 мкл лигазной геномной ДНК и кДНК MLuc7 изоформы и перемешали пипетированием. Инкубировали во льду 30 минут. Далее провели тепловой шок при 42°C 45 секунд и сразу поместили пробирку в лед. В пробирку добавили пять объемов среды SOC к 1 объему клеток и инкубировали 1 час при 37°C. После этого, все клетки высевали на чашку Петри со средой LB с добавлением 50 мкл ампициллина. Выращивали клетки в термостате при 37°C. Для нахождения вставок провели быстрый скрининг колоний методом ПЦР.

### **2.2.8 Бело-голубой скрининг**

Для определения рекомбинантных клонов провели бело-голубой скрининг на чашках Петри в среде LB с добавлением 50 мкл ампициллина, 50 мкл 100 mM IPTG и 50 мкл X-gal (40мг/мл). После определения титра жизнеспособных клеток электропорационную смесь клеток XL1-Blue высевали по ~1000 клеток на чашку. Выращивали клетки в термостате при 30°C. Далее белые колонии, содержащие вектор с целевыми вставками, использовали для быстрого ПЦР скрининга.

### **2.2.9 Быстрый скрининг колоний ПЦР**

Анализ рекомбинантных колоний на вставки проводили методом быстрого скрининга колоний ПЦР в термоциклере «PTC-200» MJResearch. Для этого стерильной петлей сняли часть колонии с агара и перенесли клетки в 10 мкл

деионизованной воды. Далее в пробирки добавили по 10 мкл заранее приготовленный реакционный буфер 2х, в который входили следующие компоненты:

- 5.4 мкл H<sub>2</sub>O;
- 2.0 мкл X10 Taq buff;
- 0.8 мкл 10mM dNTP;
- 0.7 мкл 10μM 5' – праймера;
- 0.7 мкл 10 μM 3' – праймера;
- 0.4 мкл Taq polymerase;

Параметры ПЦР реакции:

- 95°C – 30 сек
  - 95°C – 20 сек
  - 51°C – 30 сек
  - 72°C – 1.3 мин
  - 72°C – 7 мин
- } 22 цикла (всего 23)

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 51°C – температура отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК.

После первого второго цикла оставить на 72°C на паузу и быстро размешать на вортексе.

### 2.2.10 Выделение плазмидной ДНК для секвенирования

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* производили набором QIAprep Spin Miniprep Kit для выделения плазмидной ДНК ("QIAGEN", Германия). Выращивали клетки *E. coli* в ~6 мл LB, содержащей антибиотик, всю ночь при 30°C при 225 rpm до оптической плотности OD<sub>590</sub>=1,5. Центрифугировали клетки в 2 мл пробирках 3 раза не более 8000 rpm 2 мин, осушали осадок, в самом конце супернатант убирали пипеткой. Тщательно ресуспендировали осадок в 500 мкл буфера P1 на вортексе до однородной суспензии. Добавили 500 мкл лизирующего буфера и мягко переворачиванием тщательно перемещали до полной прозрачности раствора. Добавили 700 мкл нейтрализующего буфера, мягко смешали переворачиванием несколько раз. Центрифугировали в течение 10 мин 14000 rpm. Хлопья белка вместе с клеточной хромосомой должны выпасть в осадок. Супернатант по частям нанесли на колонку для очистки плазмидной ДНК, не более 700 мкл за раз. Центрифугировали сначала быстрым встряхиванием, потом 1 мин 14000 rpm. Слили супернатант. Нанесли на колонку 500 мкл буфера PВ для промывки ДНК. Инкубировали 1 мин. Затем центрифугировали 1 мин 14000 rpm. Удалили фильтрат. Нанесли на колонку 500 мкл буфера PЕ для промывки. Инкубировали 3 мин. Затем центрифугировали 1 мин 14000 rpm. Удалили фильтрат. Нанесли 250 мкл буфера PЕ для промывки. Инкубировали 3 мин. Затем центрифугировали 2 мин 14000rpm. Нанесли 200 мкл 70% этанола для промывки. Центрифугировали 3 мин 14000 rpm. Колонку с промытой ДНК перенесли в чистую 1.5 мл пробирку. Сушили на воздухе 10 мин. Нанесли в центр фильтра с ДНК 80 мкл элюционного буфера. Инкубировали 3 мин., центрифугировали 2 мин 14000 rpm. Оценивали концентрацию вы-

деленной плазмидной ДНК с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле в TAEх50 буфере. Концентрацию ДНК оценивали визуально по флуоресценции бромистого этидия в сравнении со стандартами молекулярного веса

### 2.2.11 Агарозный ДНК электрофорез

В 1% агарозный гель и TAEх50 буфер был добавлен интеркалирующий краситель – бромистый этидий (EtBr) до конечной концентрации 1 мкг/мл. Гель заливали на подложку для геля толщиной ~5 мм, оставляли до полного застывания. Затем, гель переносили в камеру для электрофореза и заливали буфером так, чтобы он покрыл гель на 3-5 мм.

Перед нанесением 1 мкл образца предварительно смешивали с 10 мкл буфера для электрофореза (TAEх50 with EtBr) и 1 мкл красителя. Далее с помощью пипетки образцы внесли в лунки. Так же наносили стандартные маркеры в количестве 500 нг на дорожку геля. Рабочее напряжение составляло 100В. Анализ результатов проводили УФ-спектрометрией, с использованием системы видеодокументации «AlfaImager». Характерный максимум поглощения для ДНК, связанного с бромистым этидием при  $\lambda = 260$  нм.

### 2.2.12 Анализ сиквенсов

Сиквенирование полученных образцов выполнено центром коллективного пользования СО РАН ЦКП "Геномика", г. Новосибирск.

Идентификация интронов была проведена путем сравнения последовательностей образцов генДНК и кДНК последовательностей в программе «ClustalW». Полученный элаймент (выравнивание последовательностей) был откорректирован вручную.

### 2.2.13 Синтез фрагментов ПЦР для конструкции

Синтез геномного и кДНК генов MLuc7 изоформы проводили методом ПЦР в термоциклере «PTC-200» MJResearch.

Для синтеза фрагментов смешивали реакционный буфер, на общий объем которого (50мкл) входили следующие компоненты:

- 5 мкл 10X Encyclo buff;
- 1 мкл 10 mM dNTP;
- 1,5 мкл 10  $\mu$ M 5' – 757;
- 1.5 мкл 10  $\mu$ M 3' – 806;
- 1 мкл Encyclo polymerase;
- 40 мкл H<sub>2</sub>O;
- 50–100 нг матрицы;

Параметры ПЦР реакции:

- 95°C – 2 мин
- 95°C – 20 сек



45°C – 30 сек      16 циклов (всего 17)

72°C – 1 мин

72°C – 5 мин

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 45°C – температура отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК.

#### **2.2.14 Очистка ПЦР-фрагментов набором**

Очистку ПЦР-фрагментов генДНК и κДНК для конструкции, производили набором QIAquick PCR Purification kit для очистки ПЦР-фрагментов («QIAGEN», Германия). РВ-буфер в пятикратном объеме добавляли в ПЦР реакцию и перемешивали пипетированием. Далее полученный раствор наносили на колонку и центрифугировали 1 минуту при 14000 rpm. Слили супернатант. Промывку проводили РЕ-буфером, сначала добавляли 500 мкл, инкубировали 3 минуты и центрифугировали при тех же условиях. Далее добавляли 250 мкл РЕ-буфера, инкубировали 3 минуты и центрифугировали 2 минуты 14000 rpm. После колонку помещали в чистую 1.5 мл пробирку и сушили на воздухе ~5 минут. В конце, в центр мембраны добавляли 50 мкл 0.1 EB, инкубировали 3 минуты и центрифугировали 2 минуты 14000 rpm.

#### **2.2.15 Рестрикция**

Для рестрикции смешивали реакционную смесь:

48 мкл очищенной ПЦР-реакции;

6 мкл 10X B-SE;

1.2 мкл 50X BSA;

2 мкл Kpn I;

Далее смесь инкубировали при 37°C 1 час. После в реакцию добавляли оставшиеся компоненты:

3 мкл 1M NaCl;

2 мкл Xho I;

И инкубировали еще 1 час при 37°C.

После рестрикции фрагменты разделяли препаративным электрофорезом.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ОБСУЖДЕНИЕ**

Изъяты страницы 22-34 в связи с авторскими правами

## ВЫВОДЫ

Выделена геномная ДНК из замороженных копепод *Metridia longa* для синтеза геномных генов.

Подобраны оптимальные условия для синтеза геномных и кДНК вариантов генов MLuc2 и MLuc7 изоформ люциферазы.

Идентифицированы 12 кДНК и 4 генДНК клонов для MLuc2 изоформы и 15 кДНК и 10 генДНК клонов для MLuc7 изоформы.

Выделена плазмидная ДНК с генами в количестве, достаточном для секвенирования.

Изоформы люциферазы *M. longa* MLuc2 и MLuc7 являются неаллельными паралогичными генами.

MLuc2 имеет 4 интрона, MLuc7 – 3 интрона.

Интрон в середине высококонсервативного мотива повторяющейся последовательности уже был в предковой последовательности до образования люциферазного гена путем тандемного повтора.

В сравнении с MLuc2 изоформой, у MLuc7 на один интрон меньше, что подтверждает их статус неаллельных паралогичных генов.

При сравнении всех клонов выявлены 3 аллеля для двух изоформ: 2 аллеля для MLuc1-158S изоформы и 1 аллель для MLuc2-158T.

При сравнении всех клонов для MLuc7 изоформы выявлены 2 аллеля: MLuc7-578G и MLuc7-578A.

Создана конструкция с геномным и кДНК генами MLuc7 в экспрессионном эукариотическом векторе pсDNA3.1+ для сравнения репортерных свойств геномного и кДНК вариантов в клетках млекопитающих.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

bp – пара нуклеотидов

Cys – аминокислота Цистеин

kb – тысяча пар нуклеотидов

mM – миллимоль/литр,  $10^{-3}$

MLuc – люцифераза копепод *Metridia longa*

OD – оптическая плотность

а. о. – аминокислотный остаток

генДНК – геномная дезоксирибонуклеиновая кислота

кДа – килодальтон, 1000 а.е.м.

кДНК–комплементарная мРНК дезоксирибонуклеиновая кислота

мкл – микролитр,  $10^{-6}$  л

мл – миллилитр,  $10^{-3}$  л

M – концентрация, моль / литр

нм – нанометр,  $1 * 10^{-9}$  метров

ПЦР – полимеразная цепная реакция

фмоль – фемтомоль,  $10^{-15}$  моль

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Markova, S. V. Shining Light on the Secreted Luciferases of Marine Copepods: Current Knowledge and Applications / S. V. Markova, M. D. Larionova, E. S. Vysotski // Photochemistry and photobiology. – 2018
2. Маркова, С. В. Целентеразин – зависимые люциферазы (обзор) / С. В. Маркова, Е. С. Высоккий // Биохимия. – 2015. – Т. 80. – № 6. – С. 845 – 866.
3. Markova, S. V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme / S. V. Markova, S. Golz, L. A. Frank, B. Kalthof, E. S. Vysotski // Journal of Biological Chemistry. – 2004. V. 279. – № 5. – P. 3212–3217.
4. Grice, G. G. Copepods collected by the nuclear submarine Seadragon on a cruise to and from the North Pole, with remarks on their geographical distribution / G. G. Grice // J. Mar. Res. – 1962. – V. 20. – P. 97 – 109.
5. Hopkins, C. C. E. Ecological investigations of the zooplankton community of Balsfjorden, northern Norway: changes in zooplankton abundance and biomass in relation to phytoplankton and hydrography / C. C. E. Hopkins // KielerMeeresforsch., Sonderh. – 1981. – V. 5. – P. 124– 139.
6. Haq, S. M. Nutritional physiology of *Metridia lucens* and *M. longa* from the Gulf of Maine / S. M. Haq // Limnol. Oceanogr. – 1967. – V. 12. – P. 40 – 51.
7. Gronvik, S. Ecological investigations of the zooplankton community of Balsfjorden, northern Norway: Generation cycle, seasonal vertical distribution, and seasonal variations in body weight and carbon and nitrogen content of the copepod *Metridia longa* (Lubbock) / S. Gronvik, C. C. E. Hopkins // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 1984. – V. 80. – № 1. – P. 93–107.
8. Lacroix, G. Les fluctuations quantitatives de la Baie-Des-Chaleurs (Golf du Saint-Laurent) / G. Lacroix, G. Filteau // Nat. Can. – 1971. – V. 98. – P. 775-813.
9. Herring P. J. Copepod luminescence // Hydrobiologia. – 1988. – Т. 167. – № 1. – С. 183-195.
10. Thompson, E. M. Cloning and expression of κДНК for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorfi* / E. M. Thompson, S. Nagata, F. I. Tsuji // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. V. 86. –P. 6557 – 6571.
11. Inouye, S. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: κДНК cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase / S. Inouye, K. Watanabe, H. Nakamura, O. Shimomura // FEBS Lett.– 2000. V. 481. –P. 19 – 25.
12. Verhaegen M., Christopoulos T. K. Recombinant Gaussia luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization // Analytical chemistry. – 2002. – Т. 74. – №. 17. – С. 4378-4385.
13. Markova S. V. et al. The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* // Biochemical and biophysical research communications. – 2015. – Т. 457. – №. 1. – С. 77-82.

14. Ларионова, М. Д. Новые изоформы люциферазы из копеподы *Metridia longa*: свойства и применение : автореферат дис. кандидата биологических наук: 03.01.02/ Ларионова Марина Дмитриевна. – Красноярск, 2018. – 22 с.
15. Larionova MD, Markova SV, Vysotski ES. The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: Properties of a high-purity protein produced in insect cells. *BiochemBiophys Res Commun*. 2017 Jan 29;483(1):772-778
16. Markova, S. V. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa* / S. V. Markova, L. P. Burakova, E. S. Vysotski // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2012. V.417. –P. 98 – 103.
17. Маркова, С. В. Билюминесцентный мониторинг обеспечивает возможность регистрации внутриклеточных событий в реальном времени без разрушения клеток и тканей / С. В. Маркова, Н. П. Маликова, Е. С. Высоцкий, Л. А. Франк, И. И. Гительзон // *Биофизика*. – 2017. – Т. 62. – № 3. – С. 618 – 624.
18. Wehr, M. C. Split protein biosensor assays in molecular pharmacological studies / M. C. Wehr, M. J. Rossner // *Drug Discovery Today*. – 2016. –V. 21. – № 3. – P. 415–429.
19. Sun, S. In vivo analysis of protein-protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET): Progress and prospects / S. Sun, X. Yang, Y. Wang, X. Shen // *International Journal of Molecular Science* – 2016. –V. 17. – № 10. – P. 21.
20. Kerppola T. K. Complementary methods for studies of protein interactions in living cells // *Nature methods*. – 2006. – Т. 3. – №. 12. – С. 969-971.
21. Nei M., Rooney A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families // *Annual review of genetics*. – 2005. – Т. 39. – С. 121.
22. Ohta T. Gene families: multigene families and superfamilies // *eLS*. – 2008.
23. Льюин Б. Гены / Б. Льюин ; пер. 9-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 896 с. – ISBN 978-5-94774-793-5.
24. Eirín-López J. M. et al. The birth-and-death evolution of multigene families revisited // *Repetitive DNA*. – 2012. – Т. 7. – С. 170-196.
25. Биология. В 2 кн. Кн. 1: Учеб. для медиц. спец. Вузов / В.Н. Ярыгин, В.И. Васильева, И.Н. Волков, В.В. Синельщикова; Под ред. В.Н. Ярыгина. — 5-е изд., испр. и доп. — М.: Высш. шк., 2003.— 432 с. – ISBN 5-06-004588-9
26. Ohta T. Multigene families and the evolution of complexity // *Journal of molecular evolution*. – 1991. – Т. 33. – №. 1. – С. 34-41.

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой



подпись, дата      инициалы, фамилия

«24» июня 2022 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Получение и анализ геномных вариантов генов изоформ люциферазы *Metridia longa* для создания стабильных репортерных клеточных линий

Руководитель



подпись, дата

24.06.22 с.н.с., канд. биол. наук С. В. Маркова

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Студент



подпись, дата

24.06.22

М. О. Вяткина

инициалы, фамилия

Красноярск 2022