

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  
Т.Г. Волова  
подпись инициалы, фамилия

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

### МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

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

тема

06.04.01 – Биология

код и наименование направления

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

код и наименование магистерской программы

Руководитель

\_\_\_\_\_

подпись, дата

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

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_

подпись, дата

М. О. Вяткина

инициалы, фамилия

Рецензент

\_\_\_\_\_

подпись, дата

с.н.с, канд. биол. наук М.Ю. Трусова

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Красноярск 2024

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Получение геномных вариантов генов изоформ люциферазы *Metridia longa* для создания стабильных репортерных клеточных линий» состоит из 44 страниц текстового документа, 26 рисунков, 1 таблицы и 31 использованных источников литературы.

Целью данного исследования являлось клонирование геномных вариантов генов изоформ люциферазы *Metridia longa* для понимания генетической организации и эволюции биолюминесцентной системы копепод, а также поиск потенциально лучших вариантов генов люциферазы для создания репортерных клеточных линий.

### БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ЛЮЦИФЕРАЗА *METRIDIA LONGA*, ИЗОФОРМЫ БЕЛКА, ИНТРОНЫ, ПАРАЛОГИЧНЫЕ ГЕНЫ

Чтобы лучше понять происхождение и эволюцию биолюминесценции копепод *M. longa*, необходимо изучить геномные последовательности, которые обеспечивают этот процесс. Геномные гены содержат интроны, которые подвергаются наибольшему эволюционному изменению, поскольку они не испытывают сильного давления естественного отбора для поддержания функции биолюминесцентного белка. Эта изменчивость позволяет идентифицировать и оценить, в том числе по временной шкале, эволюционные процессы возникновения и поддержания биолюминесцентной системы, в том числе точно идентифицировать паралогичные гены для люциферазных изоформ. Это поможет понять генетическую основу и пути развития биолюминесцентной функции копепод. Кроме того, природные варианты геномных генов могут быть 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 настоящей работы были клонированы геномные варианты генов для всех групп изоформ люциферазы *M. longa*, изолированных функциональным скринингом. Обнаружены новые аллели для 2 изоформ и новые варианты кДНК генов, возможно с новыми свойствами. Биоинформатическим анализом идентифицирована экзон-интронная структура геномных генов: *MLuc2* имеет 4 интрона, *MLuc7* – 3 интрона, *MLuc39* и *MLuc164* – 5 интронов. Мы установили, что интроны в середине высококонсервативных повторов, идентифицируемых в люциферазе *Metridia*, уже были в предковой последовательности до образования люциферазного гена путем тандемного повтора. Подтверждено наличие у *Metridia longa* как минимум 4 групп паралогичных (неаллельных) генов для люциферазы, сформировавшихся в ходе параллельной эволюции после множественной дупликации в геноме гена предковой люциферазы. Показано, что варианты геномного и кДНК генов *ML7* изоформы дают одинаково высокий уровень биолюминесцентного сигнала с одинаковым уровнем секреции при транзientной экспрессии в клетках НЕК293, что открывает возможности использования геномного варианта для создания высокостабильных репортерных клеточных линий.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1 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> .....	9
1.3 1.3 Практическое применение люциферазы <i>Metridia longa</i> в качестве репортерного белка.....	11
1.4 Мультигенные семейства в геномах как гарантия обеспечения надежности функции белка.....	13
Глава 2. Материалы и методы.....	15
2.1 Материалы.....	15
2.2 Методы.....	16
2.2.1 Выделение геномной ДНК.....	16
2.2.2 Синтез геномной и кДНК генов <i>MLuc39</i> изоформы люциферазы <i>Metridia</i> .....	16
2.2.3 Синтез геномных и кДНК генов <i>ML164</i> изоформы люциферазы <i>Metridia</i> .....	17
2.2.4 Выделение ДНК из агарозного геля.....	19
2.2.5 Лигирование.....	19
2.2.6 Приготовление электрокомпетентных клеток.....	20
2.2.7 Трансформация клеток <i>E. coli</i> электропорацией.....	20
2.2.8 Бело-голубой скрининг.....	20
2.2.9 Быстрый скрининг колоний ПЦР.....	20
2.2.10 Выделение плазмидной ДНК для секвенирования.....	21
2.2.11 Агарозный ДНК электрофорез.....	22
2.2.12 Анализ сиквенсов.....	22
2.2.13 Транзientная экспрессия конструкций генДНК и кДНК <i>MLuc7</i> в клетках эмбрионального рака почки человека НЕК293.....	22
2.2.14 Измерение биолюминесцентной активности клеток.....	23
Глава 3. Результаты экспериментов и обсуждение.....	24
3.1 Выделение геномной ДНК из копепод <i>Metridia longa</i> . Дизайн праймеров и подбор оптимальных условий для амплификации геномных и кДНК вариантов генов изоформ люциферазы.....	24

3.2 Выделение фрагментов из агарозного геля.....	30
3.3 Схема клонирования в вектор pAL2-T.....	31
3.4 Приготовление электрокомпетентных клеток. Трансформация электропорацией и высев клонов.....	32
3.5 Скрининг рекомбинантных клонов.....	32
3.6 Выделение плазмидной ДНК на секвенирование и оценка концентрации.....	34
3.7 Анализ результатов секвенирования генДНК и кДНК.....	34
3.8 Сравнение эффективности геномного и кДНК генов люциферазы M <sub>Luc7</sub> в клетках эмбрионального рака почки человека HEK293.....	38
Выводы.....	40
Список сокращений.....	41
Список используемых источников.....	42

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время люцифераза, полученная из копепод *Metridia longa*, является широко применяемым высокочувствительным билюминесцентным репортером в различных исследованиях *in vivo* и *in vitro*. Это обусловлено привлекательными свойствами белка: небольшой размер, простая кофактор-независимая реакция, для которой требуется только субстрат целетеразин и кислород, высокая билюминесцентная активность, линейная зависимость величины светового сигнала люциферазы от ее концентрации, высокая стабильность и термостойчивость, отсутствие цитотоксичности [1].

Структура люциферазы включает в себя отщепляемый сигнальный пептид, вариабельный N-конец и консервативную C-концевую часть, состоящую из двух неидентичных тандемных повторов длиной около 70 аминокислотных остатков, каждый из которых содержит высоко-консервативный мотив длиной 32 аминокислотных остатка [2].

Ранее для люциферазы *M. longa* функциональным скринингом было обнаружено одиннадцать кДНК генов, кодирующих ее различные изоформы. Анализ последовательностей выявил четыре группы изоформ с межгрупповой идентичностью от 83 до 54% [3]. Такие существенные различия в кДНК последовательностях позволяют предположить, что они представляют собой продукты неаллельных генов. Это означает, что билюминесцентная функция копепод поддерживается по меньшей мере четырьмя парами паралогичных генов, развившихся независимо друг от друга после многократных дупликаций в геноме предкового светящегося копепода [1].

Для более полного понимания происхождения и эволюции билюминесценции копепод *M. longa* необходимо расшифровать геномные последовательности, ответственные за ее билюминесцентную функцию. Последовательности интронов подвержены наибольшему мутационным изменениям, так как не испытывают сильного давления естественного отбора для поддержания функции билюминесцентного белка, и содержат больше информации об эволюции билюминесцентной функции, вплоть до 4 идентификации времени разделения паралогичных генов в соответствие с теорией нейтральной эволюции. Знание последовательностей интронов также может помочь в точной идентификации групп паралогичных генов, что позволит лучше понять генетическую основу и пути эволюции билюминесцентной функции копепода.

Кроме того, природные варианты геномных генов могут оказаться наилучшим вариантом для экспрессии в эукариотических системах при использовании люциферазы в качестве генетически-кодируемого репортера, например, в клетках млекопитающих, а также обеспечить большую стабильность получаемых репортерных клеточных линий. В исследовании [4] был создан репортерный вектор с гуманизированной люциферазой *Metridia longa* (hMLuc) включающий также промотор и первый интрон гена  $\beta$ -актина человека, содержащего энхансер этого гена. Полученный вектор затем использовали для трансфекции в нескольких клеточных линиях человека (C4-2, LNCaP, PC-3, HCT-116) и мыши (Tramp-C2). Результаты показали, что использование промотора и энхансера  $\beta$ -актина

обеспечило стабильный и высокий уровень экспрессии hMLuc, который коррелировал в широком линейном диапазоне с количеством жизнеспособных клеток.

Целью данной работы было клонирование геномных вариантов генов изоформ люциферазы *Metridia longa* для понимания генетической организации и эволюции биолюминесцентной системы копепод, а также поиск потенциально лучших вариантов генов люциферазы для создания репортерных клеточных линий.

В задачи исследования входило:

- дизайн праймеров и 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;
- сравнение эффективности экспрессии конструкций с геномным и кДНК генами MLuc7 в клетках эмбрионального рака почки человека HEK293.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

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

Среди каланоидных копепод биолюминесцентные виды составляют 5–59% численности и 10–15% биомассы в мировом океане. Большинство светящихся видов относятся к надсемейству *Augaptiloidea*. Состав биолюминесцентных видов каланоидных веслоногих имеет широтный характер; 5–25% от общего числа каланоидных копепод обитают в океанах высоких широт, а 34–59% - в океанах низких широт, что отражает отношения между добычей и хищником [5]. Гены, кодирующие люциферазы, в надсемействе *Augaptiloidea* были идентифицированы только для шести родов, принадлежащих к трем семействам (Рис.1): *Heterorhabdidae*, *Lucicutiidae*, *Metridinidae* [1]. Также сообщается, что биолюминесценцией обладает семейство *Augaptilidae* [5], но гены, кодирующие ее люциферазу, найдены не были.

Superfamily	Family	Genus	Species
Augaptiloidea (or Arietelloidea) of order Calanoida (includes seven families)*	Metridinidae (includes three genera)	<i>Metridia</i> <i>Gaussia</i> <i>Pleuromamma</i>	<i>M. longa</i> , <i>M. curticauda</i> , <i>M. asymmetrica</i> , <i>M. pacifica</i> , <i>M. okhotensis</i> <i>G. princeps</i> <i>P. scutullata</i> , <i>P. xiphias</i> , <i>P. abdominalis</i>
	Heterorhabdidae (includes seven genera)	<i>Heterorhabdus</i>	<i>H. tanneri</i>
	Lucicutiidae (includes one genus)	<i>Lucicutiidae</i>	<i>H. major</i> <i>L. ovaliformis</i>

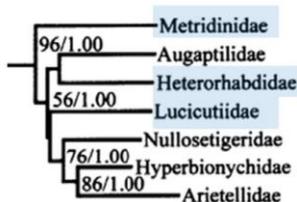


Рисунок 1 – Таксономические взаимоотношения видов копепод, у которых были идентифицированы гены люциферазы [1]

*Metridia longa* – небольшой (~1,5 мм) светящийся морской копепод из семейства *Metridinidae*, классифицированный как арктический глубоководный вид, основной ареал которого находится в северной части Северной Атлантики и Арктики. Сообщается также, что этот вид обитает в более глубоких водах южной части Северной Атлантики [6]. Формы *M. longa* составляют значительную часть зоопланктона холодных вод 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* они составляют около 40-50% среднегодовой биомассы зоопланктона [7].

Репродуктивный цикл каланоидных копепод тесно связан с их трофическим положением. Существует некоторая дискуссия относительно рациона копепод *M. longa*, и он по-разному классифицируется как преимущественно травоядный, всеядный или хищный [7]. Однако все предположения оказались так или иначе верными, поскольку *M. longa* в основном питается фитопланктоном, когда его много, но иногда может потреблять и другую пищу, такую как, например, микрозоопланктон [8, 9].

У видов, которые в основном являются травоядными, период нереста и, следовательно, развитие их молоди совпадает с периодами высокой продуктивности фитопланктона. Исследование сообщества зоопланктона в Балсфьордене, Северная Норвегия [10] показало, что *M. longa* достигает пика нереста на 2-3 недели позже, чем *Calanus finmarchicus*, которые нерестятся во время весеннего цветения. Это также подтверждается исследованиями развития половых желез, которые показывают, что у большинства взрослых самок *M. longa* яичники созревают в апреле-мае. Исследования в других, более южных регионах показали, что у *M. longa* есть два периода размножения, один весной, а другой осенью [11], но при изучении их жизненного цикла в Балсфьорде нет никаких сомнений в том, что у *M. longa* есть только один период размножения – летний. Это исследование также показало, что большинство молодых копепод, появившиеся в начале июня, развиваются в очевидной последовательности в течение лета, а переход к взрослой стадии происходит осенью, причем самцы развиваются быстрее, чем самки, которые появляются первыми [10].

Яркая синяя люминесценция возникает в результате выделения секрета из эпидермальных желез в области головы и брюшной полости (Рис.2) в ответ на механические, электрические или химические воздействия [3]. При тревоге это маленькое ракообразное выбрасывает в морскую воду яркую светящуюся жидкую «бомбу», которая, вероятно, ослепляет потенциальных хищников, приспособленных к темноте, создавая светящуюся завесу, которая служит прикрытием для побега копепода от хищника.

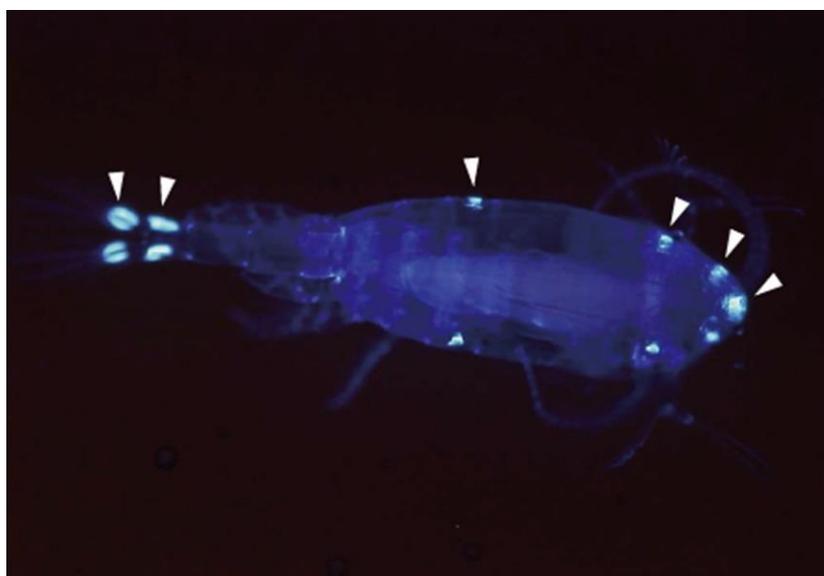


Рисунок 2 – Флуоресцентное изображение *M. okhotensis*, освещенное УФ-светом. Стрелки указывают возможное положение светящихся желез [5]

Биолюминесцентная реакция люциферазы *Metridia longa* демонстрирует кинетику типа «вспышки» (Рис.3), при которой световое излучение быстро затухает с течением времени [1]. В качестве биолюминесцентного субстрата используется небольшая молекула целентеразин, который также синтезируется самими копеподами.

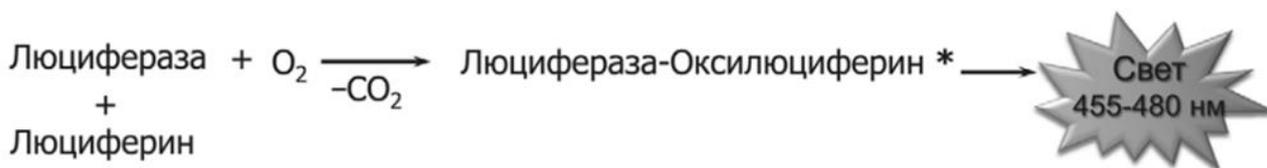


Рисунок 3 – Общая схема билюминесцентной реакции люциферазного типа [2]

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

В ранних исследованиях уже сообщалось о билюминесцентных организмах с природными секретируемыми люциферазами и о клонировании кДНК, кодирующие некоторые из этих люцифераз. Среди них морской остракод *Vargula hilgendorfi* [12], глубоководные креветки *Oplophorus gracilorostris* [13] и морской копепод *Gaussia princeps* [14]. В исследовании [3] сообщалось о клонировании люциферазы *Metridia* (MLuc), малая молекулярная масса которой (23,9 кДа) дает преимущество перед другими люциферазами, при использовании ее в качестве билюминесцентного репортера в различных аналитических приложениях. Позже сообщалось о клонировании гена кДНК, который кодирует новую секретируемую неаллельную люциферазу (MLuc7) массой 16,5 кДа у *M. longa*, которая, по сути, является самой маленькой природной люциферазой, известной на сегодняшний день [15].

Аминокислотная последовательность изоформы MLuc7 содержит 169 аминокислотных остатков и демонстрирует довольно высокую степень гомологии с остальными люциферазами веслоногих копепод. N-концевая часть зрелого фермента MLuc7 является короткой и близкой по размеру с ранее описанными высокоактивными и делетированными вариантами MLuc164. Как и другие изоформы, MLuc7 представляет собой белок, богатый цистеином, содержащий в консервативной части 10 остатков цистеина [15].

Другая изоформа MLuc2 (18,5 кДа) явно представляет другую паралогичную группу, поскольку различается от последовательностей 3-х других изоформ люциферазы *M. longa*, показывая 70% идентичности. Анализ гомологий аминокислот показал, что изоформа MLuc2 имеет большее сходство с люциферазами *M. pacifica* и *M. okhotensis* (идентичность достигает 91%). Кроме этого, изоформа MLuc2 имеет различия в структуре повторов, расположенными в консервативной области люцифераз. MLuc2 имеет укороченные консенсусные последовательности и более низкую степень идентичности между повторами по сравнению с другими описанными люциферазами *Metridia* [16].

Множественное выравнивание последовательностей люцифераз копепод показало, что условно люциферазу *Metridia* можно разделить на три части: отщепляемый сигнальный пептид, вариабельный N-конец и C-концевую консервативную часть (Рис.4). Консервативная C-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 с пятью консервативными цистеиновыми остатками, что

позволяет предположить наличие до пяти дисульфидных связей. Положения последовательности четырех остатков цистеина в каждом повторе совпадают при выравнивании (Рис.4В) [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-VDIPEISGFKEMEPMEQFIAQVDLCADCTTGCLKGLANVKSELLKKWLPDRCASFADKIQKEAHNIKGL-165
      * . * * . . * * * * * . * . * * . * * * * *

```

Рисунок 4 – (А) Множественное выравнивание изоформ люциферазы *Metridia longa*: MLuc164, MLuc39, MLuc7 и MLuc2 с GpLuc люциферазой *Gaussia princeps*. (В) Сравнение дублированных доменов MLuc7 [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

Вариабельная N-концевая часть не оказывает существенного влияния на биолюминесцентную функцию люциферазы, поскольку ее длина уменьшается 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 рис.4) приводит даже к повышению эффективности биолюминесцентной реакции [17].

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 позволяет предположить, 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. У других представителей рода *Metridia* также были найдены паралогичные гены. Для *M. pacifica* было подтверждено наличие двух паралогичных генов MpLuc1 и MpLuc2, у которых 5 и 3 интрона соответственно [18]. Для *M. okhotensis* также было идентифицировано два паралогичных гена MoLuc1 (5 интронов) и MoLuc2 (4 интрона) [19]. Стоит отметить, что положение интронов в середине консервативных повторов совпадает: один интрон разделяет сами повторы.

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

Люциферазы, секретируемые копеподами *M. longa*, широко используют в качестве высокочувствительных репортеров в различных исследованиях *in vivo* и *in vitro*, включая анализ комплементации белковых фрагментов (РСА) и иммунологические анализы, высокопроизводительные технологии скрининга и не инвазивную биолюминесцентную визуализацию *in vivo* [1]. Секретируемые репортеры являются удобным аналитическим инструментом, поскольку они дают возможность многократного наблюдения внутриклеточных процессов *in vivo* в режиме реального времени без разрушения клеток и тканей [20]. Хотя применение люцифераз веслоногих ракообразных в различных анализах *in vivo* растет из года в год, существует лишь несколько примеров их применения в аналитических анализах *in vitro* [21]. Это связано с тем, что трудно получить достаточное количество правильно свернутых люцифераз веслоногих ракообразных из-за наличия пяти дисульфидных мостиков в белке, т.к. наличие до пяти дисульфидных связей на молекулу, затрудняет получение правильно свернутых люцифераз при экспрессии в цитоплазме прокариотических клеток, где восстановительная среда препятствует образованию дисульфидных связей [1]. Недавно был разработан метод получения правильно свернутой люциферазы *Metridia* в клетках *E. coli*, что может значительно расширить ее применение в *in vitro* исследованиях [22].

Активное использование люциферазы копепод *Metridia longa* в качестве эффективных аналитических инструментов обусловлено ее привлекательными свойствами. Такими как: относительно небольшой размер (изоформа MLuc2 имеет размер в районе 18,5 кДа [16], а изоформа MLuc7 является самой маленькой, из всех известных, на сегодняшний день природных люцифераз – 16,5 кДа [3]), простая кофактор-независимая реакция (требуется лишь наличие субстрата целентеразина и молекулярного кислорода [15]). Кроме того, люцифераза чрезвычайно устойчива к высоким температурам (активность люциферазы сохраняется даже при нагреве до 100°C), не токсична для клеток, и оптимум pH находится в диапазоне 7,5-8,5, что частично перекрывается с физиологическим

диапазоном рН (6,0-8,0) [1]. Их преимуществами также является высокая биолюминесцентная активность [2], а также широкий линейный диапазон зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации белка, который составляет около шести порядков, с нижним пределом обнаружения до ~ 1 фмоль [1].

Исследования, связанные с использованием люциферазы *Metridia* в качестве биолюминесцентных репортеров, охватывает широкий спектр областей. В частности, такие исследования включают в себя иммунологические анализы, технологии высокопроизводительного скрининга, анализ комплементации белковых фрагментов (РСА) и *in vivo* не инвазивная биолюминесцентная визуализация (Рис.5) [1].

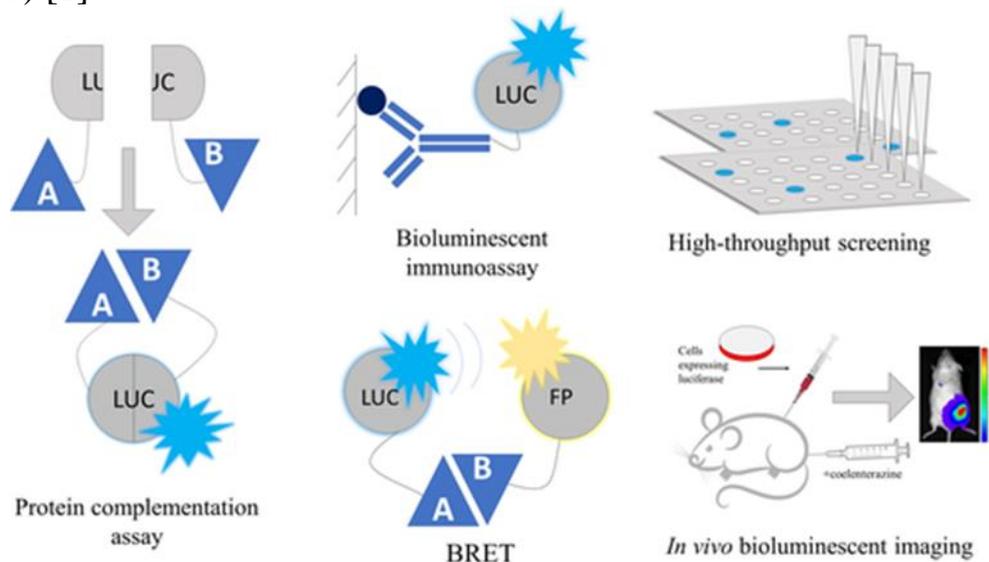


Рисунок 5 – Основные области применения люциферазы MLuc в качестве биолюминесцентного репортера согласно [1]

Использование биолюминесцентных белков в качестве меток обеспечивает высокую чувствительность обнаружения аналита в различных анализах связывания, что находит широкое применение в иммуноанализах. Благодаря *in vivo* визуализации с использованием биолюминесцентных белков, стало возможно неинвазивным и нетоксичным способом мониторить процессы в интактных клетках и моделях мелких животных [23].

Применение биоаналитических систем на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET), основанных на люциферазе, позволяет значительно улучшить глубокую тканевую оптическую визуализацию *in vivo* благодаря лучшему проникновению длинноволнового света [24]. Технологии высокопроизводительного скрининга (HTS) стали основным методом получения различных лекарственных препаратов и исследования множественных взаимодействий клеточных белков [1]. Кроме того, метод РСА (Protein-fragment complementation assay) – комплементации фрагментов репортера, активно используется в исследованиях, связанных с белок-белковыми взаимодействиями [23, 25].

Несмотря на разнообразные варианты использования люцифераз *Metridia*, их применение в качестве генетически кодируемого секретируемого репортера

для неразрушающего анализа экспрессии различных генов и работы промоторов, особенно в форматах высокопоточного скрининга, остается наиболее популярным [1].

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

Мультигенные семейства представляют собой группу генов, происходящих от общего предкового гена, что обуславливает их сходные функции и последовательности. Группу родственных мультигенных семейств иногда называют суперсемейством [26]. Суперсемейства могут выполнять разные функции, но содержат домен общего происхождения [27]. Важно отметить, что семейства генов могут различаться по степени родства между своими членами: некоторые состоят из множества идентичных представителей, в то время как другие включают гены, связанные очень дальним родством. Обычно гены в мультигенных семействах имеют сходные последовательности экзонов, но отличаются интронами. Члены семейства, тесно связанные по своей структуре, часто выполняют сходные или даже идентичные функции, хотя их экспрессия может различаться по времени или типу клеток [28].

Семейства генов в основном происходят за счет дупликации генов двумя основными механизмами: неравного кроссинговера и ретропозиции. Неравный кроссинговер обычно приводит к образованию tandemных повторов, физически связанных на хромосомах. Члены семейства в этом случае могут иметь интроны (если исходный ген имел интроны) и некодирующие регуляторные последовательности. Ретротранспозиция, напротив, встраивает безинтронную кДНК с потерями некодирующих областей, более или менее случайным образом, в местах, рассеянных по геному [29].

Организация мультигенных семейств в геноме может быть разнообразной (Рис. 6). Сгруппированные гены обычно образуют семейства с перекрывающимися функциями, в то время как рассеянные могут выполнять более разнообразные функции [27].

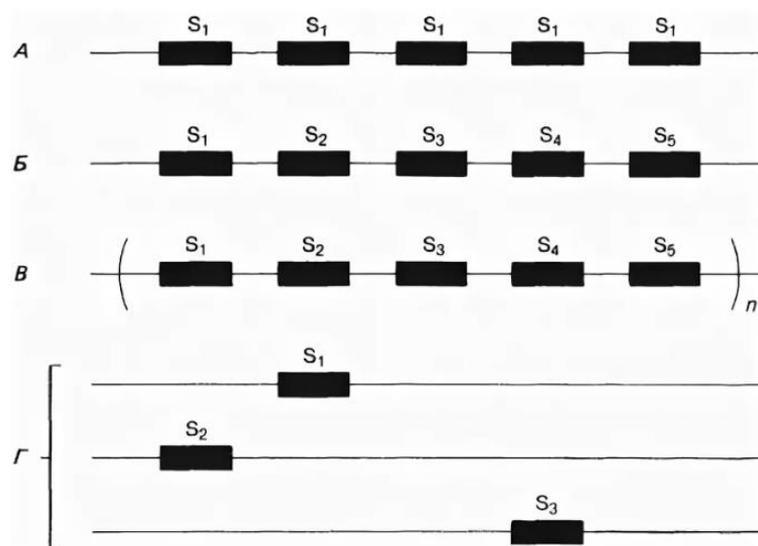


Рисунок 6 – Типы организации мультигенных семейств [30]: А – идентичные гены, сцепленные тандемно, Б – близкие, но не идентичные гены, сцепленные тандемно, В – скопления неидентичных генов, сцепленных тандемно, Г – близкие гены, рассеянные по нескольким хромосомам

Мультигенные семейства играют важную роль в организме. Первое, они обеспечивают функциональное единообразие генов, когда организму необходимо большое количество идентичного белка. Второе, когда требуется синтезировать белок, соответствующий изменяющимся условиям окружающей среды, то необходимы копии гомологичных генов с различающимися условиями проявления активности [31].

## 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 Plasmid miniprep для выделения плазмидной ДНК («Евроген», Россия);

Таблица 1 – Используемые в работе олигонуклеотиды

№	Последовательности (5'→3')
	Для синтеза ДНК MLuc 39 изоформы
848	5'-ATTTCAGACAACCTGGATCCAAA-3'
849	5'-CATAGAATATATTTATAGGAATTCC-3'
	Для скрининга MLuc 39 изоформы
848	5'-ATTTCAGACAACCTGGATCCAAA-3'
565с	5'-СТАСТСГAGVACATTGGCAAGACCCYTTGAG -3'
	Для синтеза ДНК MLuc164 изоформы
850	5'-TCAGACAACCTGGATCCAAAAG-3'
851	5'-GCATGACGTCATTTATTAGTT-3'
937	5'-TCAGACAACCTGGATCCAAAAGG-3'
938	5'-GCATGACGTCATTTATTAGTTTAC-3'
	Для скрининга MLuc164 изоформы
897	5'-GGAAGATGTCATGATTATGG-3'
938	5'-GCATGACGTCATTTATTAGTTTAC-3'
851	5'-GCATGACGTCATTTATTAGTT-3'
	Для быстрого скрининга вставок ДНК в плазмиде pAL2-T
T7pro-37	5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАGGG-3'
Sp6-879	5'-АТТТАGGTGACAСТАТАГААТАСТС-3'

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

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

-Легкоплавкая агароза («Bio-Rad»);

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

- Клетки HEK293;
- Среда DMEM/F12 (10% инактивированной термообработкой телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), 2mM L-глутамина);
- Antibiotic Antimycotic Solution (100×) (10,000 единиц/мл пенициллина, 10 мг/мл стрептомицина и 25 мг/мл амфотерицина В);
- Lipofectamine 2000 (L2000) (Invitrogen);
- Opti-Mem I (Gibco);
- ML буфер (0.5 M NaCl, 0.015% желатин, 50 mM Tris-HCl pH 7.5);
- Целентеразин (Prolume, США).

## 2.2 Методы

### 2.2.1 Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из нескольких рачков (~20 mg) *M. longa* с помощью набора DU-10 для выделения геномной ДНК из клеток и тканей («Биолабмикс», Новосибирск). Копеподы *M. longa* были собраны на Белом море в 1999 г. и хранились замороженными при -80°C. Образец в 600 мкл буфера для лизиса LB гомогенизировали стеклянным гомогенизатором. Инкубировали в течение 10 минут при температуре 15-25 °C. Затем 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. Смесь перенесли на колонку и центрифугировали в течение 30 с 10000 gcf, удалили фильтрат. Нанесли на колонку 500 мкл буфера WB1 для промывки. Центрифугировали в течение 30 с 10000 gcf и удаляли фильтрат. Нанесли на колонку 500 мкл буфера WB2 для промывки. Центрифугировали в течение 30 с 10000 gcf и удаляли фильтрат. Центрифугировали колонку 3 мин 10000 gcf, для удаления остатков буфера WB2. Перенесли колонку в новую 1,5 мл пробирку и сушили ее 5 мин. Нанесли в центр фильтра колонки 40 мкл буфера для элюции (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) и инкубировали 3 мин, центрифугировали 2 мин 10000 gcf. Далее образцы геномной ДНК использовали как матрицу для синтеза геномных генов, кодирующих изоформы люциферазы.

### 2.2.2 Синтез геномной и кДНК генов MLuc39 изоформы люциферазы *Metridia*

Синтез геномных и кДНК генов для MLuc39 изоформы проводили методом ПЦР по схеме раздельного синтеза в термоциклерах «C1000-Touch» Bio-Rad и «PTC-200» MJReserch.

Для синтеза кДНК MLuc39 изоформы смешивали реакционный буфер, в который входили следующие компоненты:

- 36,8 мкл H<sub>2</sub>O;
- 5 мкл X10 Encycl buff;

- 1 мкл 10mM dNTP;
- 2 мкл Encyclo polymerase;
- 2 мкл матрицы кДНК;

Далее реакционный буфер делили на 2 пробирки по 23,4 мкл. В первую пробирку добавили 0,8 мкл 10μM 5'-праймера 848, во вторую – 0,8 мкл 10 μM 3'-праймера 849.

Далее первую пробирку ставили при температуре отжига 63,6°C, вторую – при 54°C на 19 циклов. После первого ПЦР добавили по 0,8 мкл недостающего праймера в каждую пробирку, в первую – 3'-праймер 849 и во вторую – 5'-праймер 848. И все пробирки ставили при низшей температуре отжига – 54°C еще на 35 циклов.

Для синтеза генДНК MLuc39 изоформы смешивали реакционный буфер, на общий объем которого (25 мкл) входили следующие компоненты:

- 17,9 мкл H<sub>2</sub>O;
- 2,5 мкл X10 Encycl buff;
- 0,5 мкл 10mM dNTP;
- 1,5 мкл матрицы генДНК;
- 0,8 мкл 10μM 3'-праймера 849;
- 1 мкл Encyclo polymerase;

Далее проводили первый этап ПЦР (19 циклов) при температуре отжига для 3'-праймера 849 – 54°C. После этого в реакцию добавили 0,8 мкл недостающего 10μM 5'-праймера 848. И проводили финальный этап ПЦР (35 циклов) при низшей температуре отжига – 54°C.

Параметры ПЦР реакции для синтеза ML39 изоформы:

95°C – 2 мин	} 19 или 35 циклов
95°C – 20 сек	
63,6°C для 5'-848 и 54°C для 3'-849 – 30 сек	
72°C – 1 мин 50 сек	
72°C – 5 мин	

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 63,6°C и 54°C – температуры отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК.

### 2.2.3 Синтез геномных и кДНК генов ML164 изоформы люциферазы *Metridia*

Синтез геномных и кДНК генов проводили методом ПЦР по схеме раздельного синтеза для MLuc164 изоформы в термоциклерах «C1000-Touch» Bio-Rad и «PTC-200» MJReserch.

Для синтеза кДНК MLuc164 изоформы смешивали реакционный буфер, в который входили следующие компоненты:

- 36,8 мкл H<sub>2</sub>O;
- 5 мкл X10 Encycl buff;
- 1 мкл 10mM dNTP;

- 2 мкл Encyclo polymerase;
- 2 мкл матрицы кДНК;

Далее реакционный буфер делили на 2 пробирки по 23,4 мкл. В первую пробирку добавили 0,8 мкл 10μМ 5'-праймера 850, во вторую – 0,8 мкл 10 μМ 3'-праймера 851.

Далее первую пробирку ставили при температуре отжига 61°C, вторую – при 57°C на 19 циклов. После первого ПЦР добавили недостающий праймер в каждую пробирку по 0,8 мкл, в первую – 3'-праймер 851 и во вторую – 5'-праймер 850. И все пробирки ставили при низшей температуре отжига – 57°C еще на 35 циклов.

Параметры ПЦР реакции для синтеза кДНК ML164 изоформы:

95°C – 2 мин	} 19 или 35 циклов
95°C – 20 сек	
61°C для 5'-850 и 57°C для 3'-851 – 30 сек	
72°C – 1 мин 50 сек	
72°C – 5 мин	

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 61°C и 57°C – температуры отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК.

Для синтеза генДНК MLuc164 изоформы смешивали реакционный буфер, в который входили следующие компоненты:

- 37,4 мкл H<sub>2</sub>O;
- 5 мкл X10 Encycl buff;
- 1 мкл 10mM dNTP;
- 3 мкл матрицы генДНК;
- 2 мкл Encyclo polymerase;

Далее смесь делили на две пробирки по 24,2 мкл. В первую добавили 0,8 мкл 10μМ 5'-праймер 937, во вторую – 0,8 мкл 10μМ 3'-праймер 938.

Далее первую пробирку ставили при температуре отжига 60°C, вторую – при 54°C на 19 циклов. После первого ПЦР смешали первую и вторую пробирку и снова поделили по 25 мкл. После этого, две пробирки ставили при температуре 57°C еще на 35 циклов.

Параметры первого этапа ПЦР реакции для синтеза генДНК ML164 изоформы:

95°C – 2 мин	} 19 циклов
95°C – 20 сек	
60°C для 5'-937 и 54°C для 3'-938 – 30 сек	
72°C – 1 мин 50 сек	
72°C – 5 мин	

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 60°C и 54°C – температуры отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК.

Параметры второго этапа ПЦР реакции для синтеза генДНК ML164 изоформы:

95°C – 2 мин  
95°C – 20 сек  
67°C – 30 сек  
72°C – 1 мин 50 сек  
72°C – 5 мин

} 35 циклов

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 57°C – температуры отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК.

#### 2.2.4 Выделение ДНК из агарозного геля

Синтезированные фрагменты разделяли препаративным электрофорезом и выделяли из агарозного геля 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 «SafeImager» (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), растворяли гель. Добавляли 1 объем изопропанола и перемешивали. Вносили по 100-500 мкл раствора на колонку, центрифугировали 1 мин. при 14000 rpm. Повторяли пока не израсходовали весь объем смеси. ДНК промывали на колонке 500 мкл QG буфера и центрифугировали при тех же условиях. Далее для промывки ДНК на колонку добавляли сначала 500 мкл PE буфер, инкубировали 5 минут и центрифугировали при тех же условиях. Затем добавили 250 мкл PE буфера, инкубировали 5 минут и центрифугировали 3 мин при 14000 rpm. Колонки перемещали в стерильные 1.5 мл пробирки и сушили 10 минут. В центр мембраны колонки добавляли 30 мкл EB буфера, инкубировали 5 минут. Центрифугировали 1 мин. при 14000 rpm. После оценки концентрации ДНК электрофорезом фрагменты сшивали с вектором ДНК лигазой.

#### 2.2.5 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 входило:

- 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. Перед трансформацией в *E. coli*, лигазную смесь прогревали при 64°C 10 мин.

## 2.2.6 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, центрифугировали 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.

## 2.2.7 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 качании 150 rpm.

## 2.2.8 Бело-голубой скрининг

Для определения рекомбинантных клонов проводили 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 «PТС-200» MJResearch. Для этого стерильной петлей снимали часть колонии с агара и переносили клетки в 10 мкл деионизованной воды. Далее в пробирки добавляли по 10 мкл заранее приготовленный реакционный буфер 2x, в который входили следующие компоненты:

- 5.4 мкл H<sub>2</sub>O;

- 2.0 мкл X10 Taq buff;
- 0.8мкл 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 мин 30 сек

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 на 72°C ставили термоциклер на паузу и быстро размешивали на вортексе перед продолжением реакции.

### 2.2.10 Выделение плазмидной ДНК для секвенирования

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* производили набором Plasmid Miniprep для выделения плазмидной ДНК ("Евроген", Россия). 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 6 мл бактериальной культуры в 2 мл пробирках при 4000 rpm 3 мин, осушали осадок, в самом конце супернатант убирали пипеткой. Тщательно ресуспендировали осадок в 500 мкл «Ресуспендирующего раствора» на вортексе до однородной суспензии. Добавляли 500 мкл «Лизирующего раствора» и мягко переворачиванием тщательно перемешали до полной прозрачности раствора. Добавили 700 мкл «Нейтрализующего раствора», мягко смешали переворачиванием несколько раз. Центрифугировали в течение 10 мин 14000 rpm. Хлопья белка вместе с клеточной хромосомой должны выпасть в осадок. На спин-колонку нанесли 20 мкл «Раствора для удаления эндотоксинов». Супернатант по частям нанесли на спин-колонку для очистки плазмидной ДНК, не более 700 мкл за раз. Центрифугировали сначала быстрым встряхиванием, потом 1 мин 7000 g. Слили супернатант. Нанесли на колонку 200 мкл «раствора для удаления эндотоксинов». Центрифугировали 1 мин 7000 g. Удалили фильтрат. Нанесли на колонку 500 мкл «Промывочного раствора», инкубировали 3 мин. Затем центрифугировали 1 мин 7000 g. Нанесли на колонку 250 мкл «Промывочного раствора», инкубировали 3 мин. Центрифугировали 1 мин 7000 g. Нанесли 400 мкл 75% этанола. Центрифугировали 1 мин 7000 g. Далее пустую колонку центрифугировали 2 мин на максимальных оборотах для полного удаления этанола. Колонку с промытой ДНК перенесли в чистую 1.5 мл пробирку. Сушили на воздухе 5 мин. Нанесли в центр фильтра с ДНК 80 мкл «Элюирующего раствора». Инкубировали 3 мин., центрифугировали 2 мин 7000 g. Оценивали концентрацию выделенной 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**

Определение последовательностей изолированных клонов с геномными генами выполнено центром коллективного пользования СО РАН ЦКП "Геномика", г. Новосибирск. Полученные хроматограммы верифицировали визуально и вручную корректировали последовательности.

Идентификация интронов была проведена путем сравнения последовательностей образцов генДНК и кДНК последовательностей в программе «ClustalW» и «GeneRunner». Полученный элаймент (выравнивание последовательностей) был откорректирован вручную и окончательно обработан в стационарной программе-редакторе «BoxShadow».

### **2.2.13 Транзиентная экспрессия конструкций генДНК и кДНК MLuc7 в клетках эмбрионального рака почки человека HEK293**

Клетки HEK293 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением Antibiotic Antimycotic Solution (100×) при 37°C в атмосфере CO<sub>2</sub> (5%). После достижения 80% конфлюэнтности клеток, среду убирали и отмывали от остаток сыворотки. Для отсоединения клеток от подложки их обрабатывали трипсином. Перед посевом определяли количество и жизнеспособность клеток. В 24-луночный планшет вносили по 500 мкл среды DMEM/F12 и 120 тыс. клеток. По достижению 80% конфлюэнтности клеток среду меняли на среду без антибиотика и проводили трансфекцию. Перед трансфекцией, ДНК и трансфецирующий реагент Lipofectamine 2000 (L2000) (Invitrogen) разводили Opti-Mem I (Gibco) в бесывороточной среде, смешивали для формирования комплексов и вносили в лунки планшета. На каждую лунку планшета вносили по 500 нг ДНК

разведенной в 40 мкл Opti-Mem I, смешанной с 2 мкл L2000, также растворенном в 40 мкл Opti-Mem I. Каждую трансфекцию проводили в трех повторах. Через 4-6 часов ДНК-комплексы убирали заменой среды.

#### **2.2.14 Измерение биолюминесцентной активности клеток**

Биолюминесценцию измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader («Berthold», Германия) в 96-луночном планшете. Через 24 ч после начала трансфекции отбирали аликвоты по 5 мкл в трех повторах и вносили их в 45 мкл измерительного ML буфера в лунке планшета. Для измерения биолюминесценции, впрыскивали 50 мкл свежеприготовленного биолюминесцентного субстрата целентеразина в том же ML буфере. Финальная концентрация целентеразина была ~1 мкМ.

### **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ОБСУЖДЕНИЯ**

Изъятые страницы 24-39 в связи с авторскими правами

## ВЫВОДЫ

1. Созданы праймеры и подобраны оптимальные условия для синтеза геномных и кДНК генов изоформ люциферазы *Metridia longa*.
2. Клонированы геномные варианты генов для всех изоформ *M. longa*, изолированных функциональным скринингом. Обнаружены новые аллели для 2 изоформ и новые варианты кДНК генов, возможно с новыми свойствами.
3. Биоинформатическим анализом идентифицирована экзон-интронная структура геномных генов: *MLuc2* имеет 4 интрона, *MLuc7* – 3 интрона, *MLuc39* и *MLuc164* – 5 интронов.
4. Интроны в середине высококонсервативных повторов, идентифицируемых в люциферазе *Metridia*, уже были в предковой последовательности до образования люциферазного гена путем тандемного повтора.
5. Подтверждено наличие у *Metridia longa* как минимум 4 пар паралогичных неаллельных генов, сформировавшихся в ходе параллельной эволюции после множественной дупликации в геноме гена предковой люциферазы.
6. Варианты геномного и кДНК генов *ML7* дают одинаково высокий уровень биолюминесцентного сигнала с одинаковым уровнем секреции при транзientной экспрессии в клетках HEK293, что предполагает успешное использование генДНК *MLuc7* для создания стабильных репортерных клеточных линий.

## 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,  $1 \cdot 10^{-9}$  метров

ПЦР – полимеразная цепная реакция

фмоль – фемтомоль,  $10^{-15}$  моль

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Markova S. V., Larionova M. D., Vysotski E. S. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: Current knowledge and applications // *Photochemistry and photobiology*. – 2019. – Т. 95. – №. 3. – С. 705-721.
2. Маркова, С. В. Целентеразин – зависимые люциферазы (обзор) / С. В. Маркова, Е. С. Высоцкий // *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. Lupold S. E. et al. A real time *Metridia* luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the  $\beta$ -actin promoter and enhancer // *PloS one*. – 2012. – Т. 7. – №. 5. – С. e36535.
5. Takenaka Y., Yamaguchi A., Shigeri Y. A light in the dark: ecology, evolution and molecular basis of copepod bioluminescence // *Journal of plankton research*. – 2017. – Т. 39. – №. 3. – С. 369-378.
6. 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.
7. 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.
8. Сергеева, В. М. Особенности распределения и питания доминирующих видов зоопланктона в условиях осеннего развития кокколитофорид в восточной части Баренцева моря / В. М. Сергеева, А. В. Дриц, М. В. Флинт // *Океанология*. – 2019. – Т. 59. – № 5. – С. 734-745. – DOI 10.31857/S0030-1574595734-745.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Thompson, E. M. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii* / E. M. Thompson, S. Nagata, F. I. Tsuji // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1989. V. 86. – P. 6557 – 6571.
13. Inouye, S. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase / S. Inouye, K. Watanabe, H. Nakamura, O. Shimomura // *FEBS Lett.* – 2000. V. 481. – P. 19 – 25.

14. 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.
15. 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.
16. Larionova M. D., Markova S. V., Vysotski E. S. The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: Properties of a high-purity protein produced in insect cells // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2017. – Т. 483. – №. 1. – С. 772-778.
17. 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.
18. Takenaka Y. et al. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica* // *Gene*. – 2008. – Т. 425. – №. 1-2. – С. 28-35.
19. Takenaka Y. et al. Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods // *Molecular biology and evolution*. – 2012. – Т. 29. – №. 6. – С. 1669-1681.
20. 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.
21. Larionova M. D. et al. The smallest isoform of *Metridia longa* luciferase as a fusion partner for hybrid proteins // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Т. 21. – №. 14. – С. 4971.
22. Markova S. V., Larionova M. D., Vysotski E. S. Production of *Metridia Luciferase* in Native Form by Oxidative Refolding from Inclusion Bodies // *Bioluminescence*. – Humana, New York, NY, 2022. – С. 59-73.
23. 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.
24. 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.
25. Kerppola T. K. Complementary methods for studies of protein interactions in living cells // *Nature methods*. – 2006. – Т. 3. – №. 12. – С. 969-971.
26. Nei M., Rooney A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multi-gene families // *Annual review of genetics*. – 2005. – Т. 39. – С. 121.
27. Ohta T. Gene families: multigene families and superfamilies // *eLS*. – 2008.
28. Льюин Б. Гены / Б. Льюин; пер. 9-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 896 с. – ISBN 978-5-94774-793-5.

29. Eirín-López J. M. et al. The birth-and-death evolution of multigene families revisited //Repetitive DNA. – 2012. – Т. 7. – С. 170-196.

30. 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.

31. Ohta T. Multigene families and the evolution of complexity //Journal of molecular evolution. – 1991. – Т. 33. – №. 1. – С. 34-41.

