

Плазмидная конструкция для создания модели трансгенной мыши для изучения токсичности аминокликозидов

Абильмажинова Алия Темиргалиевна

Выпускник (бакалавр)

Евразийский национальный университет имени Л. Н. Гумилёва, Факультет естественных наук, Кафедра биотехнологии и микробиологии, Астана, Казахстан

E-mail: aliya.abilmazhinova@nu.edu.kz

Введение:

Аминокликозиды (АГ) представляют собой большое семейство водорастворимых поликатионных аminosахаров, которые используются как антибактериальные препараты широкого спектра действия. В дополнении к своей антимикробной эффективности АГ могут вызвать побочные токсические эффекты на почки и внутренне ухо.

АГ могут вызвать нарушения трансляции мРНК при взаимодействии с рибосомами во время синтеза белка. Один тип инициированного лекарственными препаратами ошибки трансляции является стоп-кодон. Поэтому благодаря измерению прочтений стоп кодонов в различных органах возможно проведение точного мониторинга локальной концентрации аминокликозидов.

Цель данного исследования является создание модели трансгенной мыши, экспрессирующей конструкцию «read-through», и изучение фармакокинетики и токсичности аминокликозидов с использованием этой модели.

Методы и материалы:

Используя стандартный метод клонирования ДНК было сконструировано несколько вариантов векторов, кодирующих связанные белки TurboGFP и TurboFP635, которые разделены стоп-кодом, регулируемых промотером млекопитающих и сигналом полиаденилирования. В качестве стартового вектора использовались имеющиеся в продаже плазмиды pTurboGFP-C и pTurboFP635-C от компании Evrogen. Полученные конструкции TurboGFP-stop-TurboFP635 были экспрессированы в коммерческих, доступных *in vitro* системах трансляции бактерии *E. coli*, а так же протестированы на временных и стабильных трансфицированных клеточных линиях НЕК. Мониторинг экспрессии обоих протеинов в присутствии и отсутствии лекарственных средств и изучение корреляции между концентрацией лекарства и уровнем «read-through» эффекта осуществлялся на основе «fluorescence imaging system» на базе лазерной детекции.

Результаты:

Создана плазмидная конструкция, состоящая из связанных кодирующих областей TurboGFP и FP635, разделенных стоп-кодом. Результаты измерения продукции белков в *in vitro* системе *E. coli* в течение 30 минут показали рост уровня экспрессии TurboGFP белка при наличии АГ.

Получены трансфицированные линии клеток НЕК (временная трансфекция). Проведен мониторинг экспрессии обоих белков TurboGFP и TurboFP635 в присутствии и отсутствии генетина (200-1000 мкг/мкл) и измерен эффект «read-through» как отношение TurboFP635:TurboGFP. Полученные результаты показали исправность работы конструкции, так как наблюдался небольшой рост эффекта «read-through».

Выводы:

Впервые в Казахстане начато исследование для изучения биологических механизмов токсичности аминогликозидов на основе использования конструкции, состоящей из двух кодирующих регионов в одной рамке считывания и разделенных стоп-кодоном, экспрессирующие «read-through» уровень.