

<https://doi.org/10.17116/molgen201937041186>

## Оптимизированный метод получения рекомбинантных аденовирусных плазмид без использования электропорации

© М.В. ШЕПЕЛЕВ, И.В. КОРОБКО

ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия, 119334

Рекомбинантные аденовирусы широко используются для доставки и экспрессии трансгенов как для терапевтических целей, так и в фундаментальных исследованиях. Система аденовирусных векторов AdEasy™ позволяет быстро и эффективно создавать рекомбинантные репликативно-дефицитные аденовирусы. Получение рекомбинантной аденовирусной плазмиды за счет гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* BJ5183 между шаттл-вектором, кодирующим трансген, и плазмидой pAdEasy-1, несущей большую часть генома аденовируса человека серотипа 5 (Ad5), является одним из важнейших этапов при создании рекомбинантных аденовирусов. Во многих опубликованных протоколах указывается на необходимость трансформации шаттл-вектора и плазмиды pAdEasy-1 в клетки *E. coli* путем электропорации, что требует наличия соответствующего оборудования и расходных материалов. В данной работе нами был предложен оптимизированный протокол получения рекомбинантных аденовирусных плазмид с использованием только химически компетентных клеток *E. coli*, без применения электропорации. Показана эффективная трансформация неочищенного линейаризованного шаттл-вектора в химически компетентные клетки штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1, позволяющая идентифицировать клоны с корректными рекомбинантными аденовирусными плазмидами. С использованием оптимизированного протокола были получены четыре функциональных репликативно-дефицитных аденовируса, экспрессирующих целевые белки в клетках HEK293. Предложенный протокол позволяет существенно упростить и удешевить методологию получения рекомбинантных аденовирусов, так как отпадает необходимость использования оборудования и расходных материалов для электропорации.

**Ключевые слова:** система AdEasy, рекомбинантная аденовирусная плазида, репликативно-дефицитный аденовирус, pAdEasy-1, pShuttle-CMV.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шепелев М.В. — e-mail: mshepelev@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3639-3048>

Коробко И.В. — e-mail: korobko1305@gmail.com

### АВТОР, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ПЕРЕПИСКУ:

Шепелев М.В. — e-mail: mshepelev@mail.ru

### КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Шепелев М.В., Коробко И.В. Оптимизированный метод получения рекомбинантных аденовирусных плазмид без использования электропорации. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019;37(4):186-191. <https://doi.org/10.17116/molgen201937041186>

## Optimized electroporation-free method for generation of recombinant adenoviral plasmids

© M.V. SHEPELEV, I.V. KOROBKO

Institute of gene biology, Russian academy of Sciences, Moscow, Russia, 119334

### Abstract

Recombinant adenoviruses are widely used for delivery and expression of transgenes for therapeutic purposes and in fundamental research. AdEasy™ adenoviral vector system allows for rapid and efficient generation of replication-deficient adenoviruses. One of the crucial steps in producing the recombinant adenoviruses is the generation of a recombinant adenoviral plasmid in *E. coli* BJ5183 cells via homologous recombination between transgene encoding shuttle vector and pAdEasy-1 plasmid, bearing the greater part of human adenovirus serotype 5 (Ad5) genome. In many published protocols the necessity of electroporation for transformation of the shuttle vector and pAdEasy-1 into *E. coli* cells is emphasized thus demanding the availability of the appropriate instruments and consumables. Here we proposed the optimized protocol for generation of recombinant adenoviruses with the use of chemically competent *E. coli* cells only, without the use of electroporation. We showed efficient transformation of linearized non-purified shuttle vector into chemically competent *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 cells allowing for identification of clones with correct recombinant adenoviral plasmids. Using the optimized protocol we generated four functional replication-deficient adenoviruses, expressing target proteins in HEK293 cells. The proposed protocol allows for significantly simplified and cheaper method for generation of recombinant adenoviruses due to lack of requirement to use instruments and consumables for electroporation.

**Keywords:** AdEasy system, recombinant adenoviral plasmid, replication-deficient adenovirus, pAdEasy-1, pShuttle-CMV.

### INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Shepelev M.V. — e-mail: mshepelev@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3639-3048>

Korobko I.V. — e-mail: korobko1305@gmail.com

## CORRESPONDING AUTHOR:

Shepelev M.V. — e-mail: mshepelev@mail.ru

## TO CITE THIS ARTICLE:

Shepelev MV, Korobko IV. Optimized electroporation-free method for generation of recombinant adenoviral plasmids. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2019;37(4): 186–191 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/molgen201937041186>

## ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ:

т.п.н. — тысяча пар нуклеотидов

КОЕ — колониеобразующие единицы

В настоящее время аденовирусы широко применяются для доставки и экспрессии трансгенов для терапевтических целей и в фундаментальных исследованиях [1]. Система аденовирусных векторов AdEasy™ является одной из наиболее часто используемых для быстрого и эффективного создания рекомбинантных репликативно-дефицитных аденовирусов. В системе AdEasy рекомбинантная аденовирусная плазмида создается посредством гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* BJ5183 между шаттл-вектором, кодирующим ген интереса, и плазмидой pAdEasy-1, несущей большую часть генома аденовируса человека серотипа 5 (Ad5). Далее полученная рекомбинантная аденовирусная плазмида трансфицируется в упаковочную клеточную линию (например, HEK293), в которой происходит сборка вирусных частиц и репликация вируса [2, 3].

Создание рекомбинантной аденовирусной плазмиды является одним из важнейших этапов получения рекомбинантных аденовирусов. В исходном варианте системы AdEasy в клетки штамма BJ5183 котрансформируют шаттл-вектор и плазмиду pAdEasy-1, отбирая канамицин-устойчивых рекомбинантов [2]. Повысить эффективность получения рекомбинантной аденовирусной плазмиды можно за счет создания штамма клеток *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1, который получают путем трансформации клеток BJ5183 плазмидой pAdEasy-1. Далее в клетки штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 трансформируют шаттл-вектор, что существенно увеличивает эффективность гомологичной рекомбинации по сравнению с котрансформацией двух плазмид в штамм BJ5183 [4].

Согласно приведенным выше протоколам [2, 4], для получения рекомбинантной аденовирусной плазмиды в системе AdEasy необходимо проведение электропорации плазмидной ДНК, что требует наличия дорогостоящего оборудования и расходников (кюветы), а также приготовления в лаборатории или приобретения высокоэффективных электрокомпетентных клеток *E. coli*. Однако в ряде работ для получения рекомбинантной аденовирусной плазмиды использовали химически компетентные клетки *E. coli* [5, 6].

Задачей данной работы была оптимизация протокола получения рекомбинантной аденовирусной плазмиды в системе AdEasy с использованием химически компетентных клеток, приготовленных в лаборатор-

ных условиях по одной из самых простых методик. В результате с использованием химически компетентных клеток нами были успешно созданы рекомбинантные аденовирусные плазмиды и получены репликативно-дефицитные аденовирусы, экспрессирующие целевые белки. Описанный нами протокол позволяет быстро и эффективно получать рекомбинантные аденовирусные плазмиды с помощью системы AdEasy без проведения электропорации, а также без дополнительной очистки линеаризованного шаттл-вектора.

## Материал и методы

**Плазмиды.** Плазмиды pShuttle-CMV и pAdEasy-1 были приобретены у компании «Agilent Technologies» (США). Для создания шаттл-векторов, кодирующих кДНК слитого белка Egfp-Pdcd4 с мутациями в кДНК Pdcd4 RBM12 S457A или RBM12 D235A D418A, *NheI* (обработан фрагментом Кленова) — *SalI* фрагменты кДНК клонировали из соответствующих векторов pEgfp-C2-Pdcd4 RBM12 S457A или pEgfp-C2-Pdcd4 RBM12 D235A D418A в вектор pShuttle-CMV по сайтам *Bg/II* (обработан фрагментом Кленова) и *SalI*. Мутантная форма Pdcd4 RBM12, несущая аминокислотные замены K60A, R61A, R62A, R64A, K65A, R102A и R103A, была описана ранее [7]. Точечные мутации вводили с помощью сайт-направленного мутагенеза с помощью метода с двумя комплементарными олигонуклеотидными праймерами на основе протокола QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit («Agilent Technologies»). В качестве матрицы в ПЦР использовали плазмиду pCR-Blunt («Invitrogen», США), несущую кДНК белка Pdcd4 человека, фланкированную сайтами рестрикции *EcoRI-SalI*. ПЦР проводили с использованием ДНК полимеразы AccuPrime Pfx («Invitrogen») в реакции объемом 50 мкл, включавшей 1-кратный реакционный буфер, 300 нМ прямого и обратного праймеров, 100 нг плазмидной матрицы и 2,5 ед. ДНК-полимеразы при следующих условиях: 94 °C — 3 мин (94 °C — 40 с, 55 °C — 1 мин, 68 °C — 5 мин) — 15 циклов, 68 °C — 3 мин. Продукт ПЦР обрабатывали рестриктазой *DpnI* в течение 2 ч для расщепления плазмидной матрицы и трансформировали 10 мкл в химически компетентные клетки *E. coli* XL-1 Blue MRF'. Мутации в различных участках кДНК Pdcd4 вводили последовательно. Далее

кДНК белка Pcdcd4 с нужными мутациями субклонировали в вектор pEGFP-C2 («Clontech», США) по сайтам *EcoRI-SalI*. Для мутагенеза использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: S457A (5'-gcagaaagcgttttagccgaaggagatggaggtc-3' и 5'-gacctccatctccttcggctaca aaacgctttctgc-3'); D235A (5'-gggacagtaaatgagcacaactgctgtg gaaaaatcatttgataaa-3' и 5'-ttatcaaatgattttccacagcagttgtgct cactactgtccc-3'); D418A (5'-ttccggacattaatctggtgtccacatt catactc-3' и 5'-gagtatgaatgtggacagccagattaatgtccgga-3'); K60A, R61A, R62A, R64A, K65A (5'-atcgctctgccagagtc ccgggatgagttgcccgtagtgccgctgctgcttggcattaattctagcttcgta atg-3' и 5'-cattaacgaagctagaattaatgccaaggcagcagcgccactag cggcaactcatcccggtactctggcagaggcgat-3'); R102A, R103A (5'-caaaggaaggttgctggatgcccagatcctggaaagg-3' и 5'-cc ttccagatctggatgcccagatccgaaccttcccttg-3'). Для создания шаттл-вектора, кодирующего внутриклеточный домен белка Notch1 крысы (аминокислотные остатки 1749 — 2531) с с-мус эпителиом на С-конце (NICD-мус), *EcoRI* (обработан фрагментом Кленова) — *NotI* фрагмент кДНК NICD-мус клонировали из вектора pEgfp-N2-NICD-мус в вектор pShuttle-CMV по сайтам *BglII* (обработан фрагментом Кленова) и *NotI*. Вектор для продукции белков с С-концевым с-мус эпителиом (pEGFP-N2-мус) создавали на основе вектора pEGFP-N2 («Clontech») путем клонирования по сайтам *BamHI-NotI* двухцепочечных олигонуклеотидов, полученных путем гибридизации одноцепочечных олигонуклеотидов, кодирующих аминокислотную последовательность с-мус эпителиома (5'-gatccgtcgacgagcaga agctgctatctccgaggaggacctgtaagc-3' и 5'-ggcgccttacagtcctcct cggagatcagctctgctgctgacg-3'). кДНК NICD амплифицировали в ПЦР с праймерами 5'-gaattcgccaccatgaagcg caggcgccagcat-3' и 5'-gtcgaccttaaatgcctctggaatg-3' и клонировали в вектор pEGFP-N2-мус по сайтам *EcoRI-SalI*, получая вектор pEgfp-N2-NICD-мус. Для создания шаттл-вектора, кодирующего протеинкиназу Pak5 человека, слитую с Egfp, *NheI* (обработан фрагментом Кленова) — *SmaI* фрагмент кДНК Egfp-Pak5 клонировали из вектора pEgfp-C1-Pak5, описанного ранее [8], в вектор pShuttle-CMV по сайту *BglII* (обработан фрагментом Кленова). Для генно-инженерных манипуляций с плазмидами и получения плазмидной ДНК в препаративных количествах использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue MRF' («Stratagene», США). Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* проводили с использованием набора GenElute Plasmid MiniPrep Kit («Sigma», США) в соответствии с протоколом производителя. Нуклеотидные последовательности всех амплифицированных в ПЦР кДНК верифицировали путем секвенирования ДНК с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer в ЦКП «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия.

**Культивирование клеток *E. coli*.** Клетки *E. coli* культивировали в жидкой среде Miller's LB broth (0,171 M

NaCl, 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт) («BD Bioscience», США) при +37 °С. Для заливки чашек Петри к среде LB добавляли бактериальный агар («BD Bioscience») до концентрации 1.5%. Клетки штамма *E. coli* BJ5183 («Agilent Technologies») культивировали в присутствии 30 мкг/мл стрептомицина, клетки штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 — в присутствии 30 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл ампициллина, клетки штамма *E. coli* XL-1 Blue MRF' — в присутствии 12,5 мкг/мл тетрациклина. В работе использовали следующие реагенты: ампициллин натрия (ОАО «Синтез», Россия), канамицин сульфат (ОАО «Биохимик», Россия), тетрациклин гидрохлорид («Sigma», США), стрептомицин (ОАО «Биохимик»).

**Приготовление и трансформация химически компетентных клеток *E. coli*.** Химически компетентные клетки штаммов *E. coli* BJ5183, *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 и *E. coli* XL-1 Blue MRF' готовили в соответствии с протоколом, описанным в [9]. В частности, клетки соответствующих штаммов высевали на селективную чашку и растили в течение ночи. На следующий день инокулировали 10 мл ночной культуры среды LB без антибиотиков и растили в течение ночи. С утра переносили 2 мл ночной культуры в 200 мл среды LB без антибиотиков и растили в течение 3—4 ч до достижения оптической плотности 0,45—0,55 при длине волны 600 нм. Клетки охлаждали на льду в течение 2 ч и центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин при +4 °С. Осадок ресуспендировали в ледяном буфере (40 mM натрия ацетат pH=5,5, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 70 mM MgCl<sub>2</sub>) и инкубировали на льду в течение 45 мин. Далее клетки осаждали центрифугированием при 1800 g в течение 10 мин при +4 °С, осадок ресуспендировали в буфере (40 mM натрия ацетат pH=5,5, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 70 mM MgCl<sub>2</sub>, 15% глицерин), суспензию клеток разливали в аликвоты по 100 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С. Трансформацию химически компетентных клеток *E. coli* проводили, как описано в [9]. В частности, к аликвоте компетентных клеток добавляли 3 мкл диметилсульфоксида, перемешивали, добавляли плазмидную ДНК, перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин. Для проведения теплового шока клетки помещали на 50 с в водяную баню (+42 °С), потом быстро переносили в лед и инкубировали на льду 1 мин. Далее суспензию клеток переносили в 1 мл среды LB без антибиотиков и инкубировали клетки при интенсивном перемешивании при +37 °С в течение 1 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием (30 с, 16 000 g), отбирали часть супернатанта и высевали клетки на предварительно прогретые до +37 °С чашки с LB агаром, содержащим соответствующие антибиотики.

**Культуры клеток.** Клетки линии НЕК293 (European Collection of Cell Cultures, #85120602) культивировали в среде DMEM («HyClone», США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («HyClone»), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («Gibco»,

США). Для трансфекции клеток линейаризованной рекомбинантной аденовирусной плазмидой использовали реагент EctoTransfect («OZ Bioscience», Франция).

**Получение рекомбинантных аденовирусов.** Рекомбинантные аденовирусные плазмиды, выделенные из клеток *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1, трансформировали в клетки *E. coli* XL-1 Blue MRF<sup>+</sup> и выделяли плазмиды в препаративных количествах. Далее, начиная с этапа линейаризации рекомбинантной аденовирусной плазмиды и трансфекции упаковочной клеточной линии HEK293, аденовирусы получали в соответствии с опубликованным протоколом [3]. В частности, 5 мкг рекомбинантной аденовирусной плазмиды линейаризовали с использованием 5 ед. эндонуклеазы рестрикции *PacI* («ThermoFisher Scientific», #ER1342) в течение 3 ч в реакции объемом 100 мкл при +37 °С, после чего добавляли 10 мкл 3М ацетата натрия pH=5,2 и 275 мкл этанола, перемешивали, инкубировали 20 мин при –20 °С, центрифугировали 10 мин при 14 000 g, промывали осадок два раза 70% этанолом, ресуспендировали в 40 мкл стерильной воды и использовали для трансфекции. Далее клетки линии HEK293 рассеивали в количестве  $1,4 \cdot 10^6$  клеток на 60-мм культуральную чашку и на следующий день трансфицировали, используя 4 мкг линейаризованной рекомбинантной аденовирусной плазмиды. Клетки культивировали в течение 15 (аденовирус NICD-мус), 17 (Egfp-Pdcd4) или 22 дней (Egfp-Pak5), каждые 2–3 дня добавляя к клеткам по 1 мл свежей среды. Далее собирали первичный вирусный сток, для выхода вируса клетки разрушали за счет двух циклов замораживания-оттаивания, после чего проводили три раунда амплификации аденовирусов и инфицирование клеток линии HEK293 вирусным стоком с предыдущего этапа (1 раунд:  $3 \cdot 10^6$  клеток на 60-мм культуральной чашке; 2 раунд:  $7 \cdot 10^6$  клеток на 100-мм культуральной чашке; 3 раунд:  $7 \cdot 10^6$  клеток на пяти 100-мм культуральных чашках). После последнего раунда амплификации аденовирус разливали в аликвоты и хранили при –70 °С.

**Вестерн-блот анализ.** Вестерн-блот анализ образцов проводили, как описано в [10], с использованием следующих антител: мышинные моноклональные к с-мус эпитопу, клон 9E10 («Sigma», #M5546, разведение 1:2000); мышинные моноклональные к  $\alpha$ -тубулину, клон DM1 $\alpha$ , («Sigma», #T9026, разведение 1:5000), мышинные моноклональные к Egfp, клон 3A9, («Протеинсинтез», Россия #PSM001, разведение 1:2000).

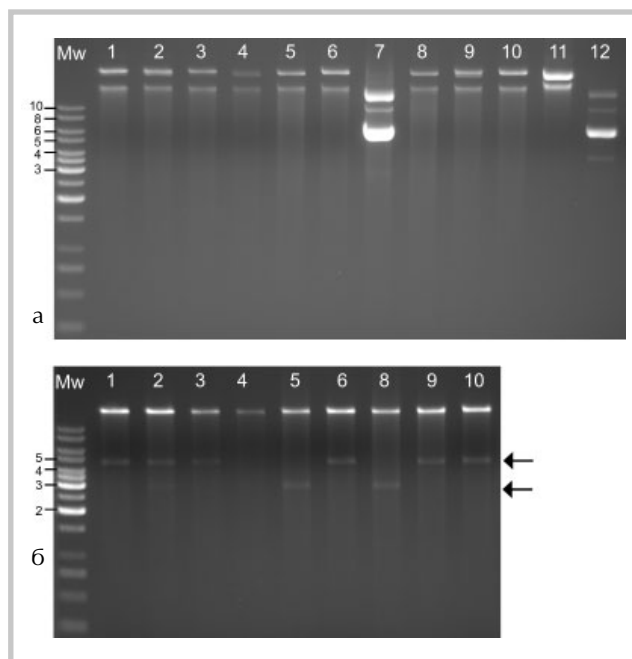
## Результаты и обсуждение

В опубликованных протоколах создания рекомбинантных аденовирусов на основе системы AdEasy для трансформации клеток *E. coli* штаммов BJ5183 или *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 используется электропорация плазмидной ДНК, что обеспечивает высокую эффективность трансформации, до  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/мкг плаз-

мидной ДНК при использовании коммерчески доступных электрокомпетентных клеток *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 [2–4]. В ряде других работ сообщалось об использовании химически компетентных клеток штамма *E. coli* BJ5183 для получения рекомбинантных аденовирусных плазмид путем котрансформации линейаризованных шаттл-вектора и аденовирусной плазмиды [5, 6], без использования штамма, аналогичного штамму *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 [4]. При этом проводили очистку шаттл-вектора из агарозного геля и переосаждение линейаризованной аденовирусной плазмиды перед котрансформацией [6] или оптимизацию соотношения количества шаттл-вектора и аденовирусной плазмиды [5]. Мы предположили, что протокол получения рекомбинантных аденовирусных плазмид можно оптимизировать и упростить за счет использования химически компетентных клеток *E. coli*, приготовленных по одной из простейших методик, создания клеток штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 для повышения эффективности гомологичной рекомбинации и отказа от очистки линейаризованного шаттл-вектора из агарозного геля перед трансформацией.

Сначала готовили химически компетентные клетки *E. coli* BJ5183 и трансформировали их плазмидой pAdEasy-1. Эффективность трансформации химически компетентных клеток *E. coli* BJ5183 составляла  $3 \cdot 10^5$  КОЕ/мкг плазмидной ДНК при использовании плазмиды pAdEasy-1 (33.4 т.п.н.). Обычно подобная эффективность считается недостаточной для использования компетентных клеток для генно-инженерных манипуляций, однако при трансформации очищенной плазмидной ДНК, и, учитывая большой размер плазмиды pAdEasy-1, подобная эффективность трансформации позволяет получить достаточное количество колоний на чашке для дальнейшего отбора и анализа корректных клонов. Далее, из нескольких колоний выделяли плазмиду pAdEasy-1 и анализировали ее с помощью эндонуклеаз рестрикции *BglII* и *HindIII*. Клетки одного из клонов с корректным паттерном рестрикции плазмиды pAdEasy-1 (данные не показаны) использовали для приготовления глициринового стока клеток штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 и далее готовили химически компетентные клетки штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1.

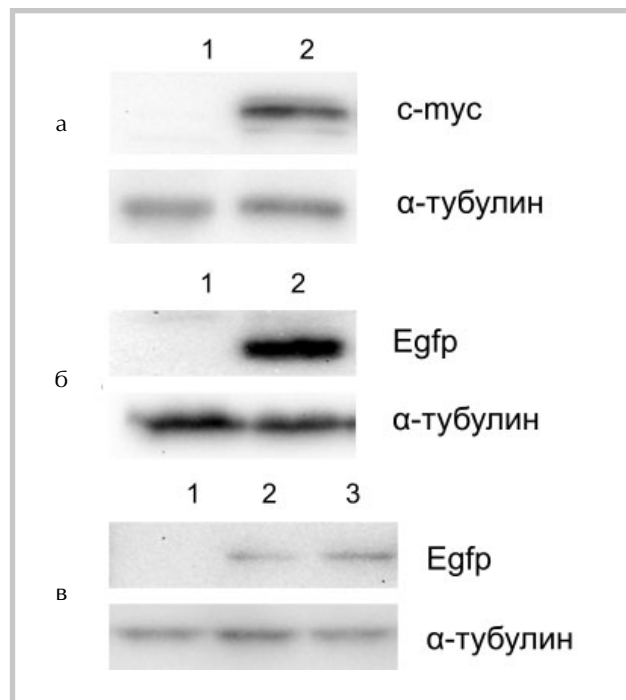
Для получения рекомбинантных аденовирусных плазмид были созданы четыре шаттл-вектора, кодирующие слитые белки Egfp-Pdcd4 RBM12 S457A, Egfp-Pdcd4 RBM12 D235A D418A, Egfp-Pak5 и NICD-мус. В ряде протоколов, включая протокол для коммерчески доступной системы AdEasy от компании «Agilent Technologies» («AdEasy XL Adenoviral Vector System Instruction Manual», Revision C1), указывается на необходимость очистки из агарозного геля шаттл-вектора после линейаризации [5, 6]. Однако было показано использование неочищенного линейаризованного шаттл-вектора для электропорации клеток штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 [4]. Мы решили использовать для



**Рис. 1.** Электрофоретический анализ потенциальных рекомбинантных аденовирусных плазмид, выделенных из клеток BJ5183-pAdEasy-1 после трансформации шаттл-вектором.

Показаны результаты гель-электрофореза в 0,9% TAE-агарозном геле суперскрученной (а) и обработанной эндонуклеазой рестрикции *PacI* (б) плазмидной ДНК, выделенной из маленьких канамицин-резистентных колоний (дорожки 1–10 на панелях а и б, на каждую дорожку нанесено 140–200 нг плазмидной ДНК). Панель а: дорожка 11 — плазида pAdEasy-1 (250 нг), дорожка 12 — вектор pShuttle-CMV-Egfp-Pdcd4 RBM12 S457A (250 нг). Положение фрагментов ДНК размером 3 и 4,5 т.п.н. указано стрелками. Слева указаны размеры фрагментов ДНК-маркера O'GeneRuler 1kb DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США) (в т.п.н.).

трансформации химически компетентных клеток *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 неочищенный шаттл-вектор, обработанный фосфатазой для минимизации рециркуляризации шаттл-вектора в клетках *E. coli*. 1 мкг соответствующих шаттл-векторов линеаризовали с использованием 5 ед. эндонуклеазы рестрикции *MssI* («ThermoFisher Scientific», #ER1342) в течение 2 ч в реакции объемом 50 мкл при +37 °C, после чего добавляли 1 ед. щелочной фосфатазы CIAP («Fermentas», #EF0341) и инкубировали еще 30 мин при +37 °C. Затем 5 мкл рестрикционной смеси (эквивалентно 100 нг плазмидной ДНК) трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 и отбирали трансформантов на чашках, содержащих 50 мкг/мл канамицина. В результате трансформации на чашках ожидается формирование колоний двух типов: больших, выросших из клеток, трансформированных недорезанным или восстановленным в результате лигирования в клетках *E. coli* шаттл-вектором, и маленьких, вырастающих из клеток, в которых произошла рекомбинация между шаттл-вектором и плазмидой pAdEasy-1. Для оценки эффективности гомологичной рекомбина-



**Рис. 2.** Вестерн-блот анализ лизатов клеток линии HEK293, инфицированных рекомбинантными аденовирусами.

Клетки HEK293 рассеивали в количестве  $1 \cdot 10^5$  в лунку 24-луночного планшета, на следующий день инфицировали аденовирусами, через 48 ч после инфекции получали клеточные лизаты и проводили Вестерн-блот анализ с использованием указанных антител. Клетки инфицировали аденовирусами для продукции белков (а) NICD-мус (дорожка 2), (б) Egfp-Pak5 (дорожка 2) и (в) Egfp-Pdcd4 RBM12 S457A и Egfp-Pdcd4 RBM12 D235A D418A, дорожки 2 и 3 соответственно. Дорожка 1 во всех панелях — неинфицированные клетки.

ции в клетках штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 при использовании предложенного нами протокола был проведен подсчет колоний двух типов. При этом было установлено, что при проведении реакций трансформации с использованием четырех созданных нами шаттл-векторов на чашках выросло в среднем  $144 \pm 31$  большая колония и  $89 \pm 27$  маленьких колоний. По 10 маленьких колоний с каждой из чашек были проанализированы на предмет наличия корректной рекомбинантной аденовирусной плазмиды с помощью анализа электрофоретической подвижности суперскрученной плазмидной ДНК (рис. 1, а) и с помощью эндонуклеазы рестрикции *PacI* (см. рис. 1, б). Как видно из рис. 1, а, 9 из 10 проанализированных клонов (кроме клона #7) с одной из чашек содержали рекомбинантную аденовирусную плазмиду. Анализ с помощью рестриктазы *PacI* выявил корректный паттерн рестрикции (наличие вырезаемых фрагментов ДНК размером 3 или 4,5 т.п.н.) для семи из девяти обнаруженных рекомбинантных плазмид (кроме клонов #2 и #4). Также был выявлен корректный паттерн рестрикции при анализе с помощью рестриктазы *HindIII* (данные не показаны).

Таким образом, нами было установлено, что эффективность трансформации химически компетентных клеток штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 неочищенным линейаризованным шаттл-вектором позволяет получить число маленьких колоний ( $890 \pm 270$  в пересчете на 1 мкг линейаризованного шаттл-вектора), достаточное для идентификации корректной рекомбинантной аденовирусной плазмиды. Более того, нами было установлено, что химически компетентные клетки *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 после года хранения при  $-80^\circ\text{C}$  сохраняют эффективность трансформации, достаточную для идентификации клонов, содержащих аденовирусную плазмиду с корректной рекомбинацией (данные не показаны).

Далее для проверки функциональности рекомбинантных плазмид получали аденовирусы в соответствии с опубликованным протоколом [3]. Проводили 3 раунда амплификации вирусных стоков, после чего инфицировали клетки HEK293 для проверки продукции соответствующих белков. На рис. 2 показаны результаты вестерн-блот анализа лизатов клеток, инфицированных стоками аденовирусов для продукции белков Egfp-Pdcd4 RBM12 S457A, Egfp-Pdcd4 RBM12 D235A D418A, Egfp-Pak5 и NICD-myc. Как видно, все полученные аденовирусы экспрессируют кодируемые шаттл-векторами кДНК.

Таким образом, нами был предложен оптимизированный протокол получения рекомбинантных аденовирусных плазмид на основе системы AdEasy, который не требует проведения электропорации и очистки линейаризованного шаттл-вектора. Нами было продемонстрировано эффективное получение рекомбинантных аденовирусных плазмид в результате трансформации химически компетентных клеток штамма *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1, приготовленных в лаборатории с помощью простой и доступной методики. Химически компетентные клетки *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1 сохраняют высокую эффективность трансформации на протяжении как минимум одного года, что позволяет быстро и эффек-

тивно создавать рекомбинантные аденовирусные плазмиды, используя единожды приготовленный запас компетентных клеток. Предложенный нами оптимизированный метод получения рекомбинантных аденовирусных плазмид основан на использовании химически компетентных клеток, создание которых доступно для практически любой молекулярно-биологической лаборатории и не требует дорогостоящих реактивов, специальных навыков или оборудования. Кроме того, показанная нами эффективность трансформации компетентных клеток *E. coli* BJ5183-pAdEasy-1, в отличие от ранее опубликованных протоколов [3, 5, 6], позволяет отказаться от проведения очистки из геля или пересадки линейаризованного шаттл-вектора, что также существенно упрощает процедуру получения рекомбинантных плазмид. Оптимизированный нами протокол подтверждает возможность отказа от проведения электропорации, что делает создание рекомбинантных аденовирусов более доступным для широкого круга пользователей за счет отсутствия необходимости использования оборудования и расходных материалов для электропорации или приобретения высокоэффективных электрокомпетентных клеток. Валидность предложенного нами подхода была подтверждена успешным получением функциональных аденовирусов, экспрессирующих соответствующие рекомбинантные белки в клетках HEK293.

В работе была использована инфраструктура Центра коллективного пользования Института биологии гена Российской академии наук «Биология живой клетки и биомедицинские нанотранспортеры лекарств».

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №16-04-00686 и №16-04-00376).

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

**The authors declare no conflicts of interest.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Wold WS, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2013;13:421–433.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:2509–2514.
- Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc.* 2007;2:1236–1247.
- Zeng M, Smith SK, Siegel F, Shi Z, Van Kampen KR, Elmetts CA, et al. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination. *Biotechniques.* 2001;31:260–262.
- Miravet S, Ontiveros M, Piedra J, Penalva C, Monfar M, Chillon M. Construction, production, and purification of recombinant adenovirus vectors. *Methods Mol Biol.* 2014;1089:159–173.
- Reddy PS, Ganesh S, Hawkins L, Idamakanti N. Generation of recombinant adenovirus using the Escherichia coli BJ5183 recombination system. *Methods Mol Med.* 2007;130:61–68.
- Wedeken L, Ohnheiser J, Hirschi B, Wethkamp N, Klempnauer KH. Association of Tumor Suppressor Protein Pdcd4 With Ribosomes Is Mediated by Protein-Protein and Protein-RNA Interactions. *Genes Cancer.* 2010;1:293–301.
- Cotteret S, Chernoff J. Nucleocytoplasmic shuttling of Pak5 regulates its antiapoptotic properties. *Mol Cell Biol.* 2006;26:3215–3230.
- Titus DE. *Promega Protocols and Applications Guide.* USA. 1991.
- Shepelev MV, Chernoff J, Korobko IV. Rho family GTPase Chp/RhoV induces PC12 apoptotic cell death via JNK activation. *Small GTPases.* 2011;2:17–26.

Поступила в редакцию 25.10.18

Received 25.10.18

После доработки 15.11.18

Revised 15.11.18

Принята к публикации 26.11.18

Accepted 26.11.18