

Создание конструкций для направленной вставки генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала Voltron и Positron в локус *Rosa26*

Кириллов О.*, Ахмаров И., Чиринскайте А., Сопова Ю., Леонова Е.
Центр трансгенеза и редактирования генома, ИТБМ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия
* o-kirillov03@mail.ru

Ключевые слова: генетически кодируемые индикаторы мембранного потенциала; направленная вставка; ROSA26; Voltron; Positron

Мотивация и цель: Генетически кодируемые индикаторы мембранного потенциала представляют собой группу гибридных белков, которые позволяют визуализировать электрическую активность нейронов в режиме реального времени. Гибридные индикаторы Voltron и Positron [1] состоят из двух компонентов: бактериального родопсина Ace2, который обеспечивает высокую чувствительность и быструю кинетику, и домена HaloTag, обеспечивающего высокую фотостабильность. Voltron негативно реагирует на потенциал действия (ПД), в то время как Positron дает позитивный ответ на него. Направленная интеграция трансгенов в локус *Rosa26* обеспечивает их стабильную экспрессию, а для обеспечения тканеспецифичности используется стоп-кассета, фланкированная сайтами *loxP*. Цель данной работы – дизайн и создание конструкций, несущих последовательности индикаторов Voltron и Positron для направленной вставки в локус *Rosa26* с возможностью тканеспецифичной экспрессии трансгена.

Методы и алгоритмы: Сборка последовательности индикатора Voltron проводилась *de novo* методом полимеразной цепной реакции. В связи с тем что аминокислотная последовательность индикатора Positron отличается от последовательности Voltron тремя аминокислотными заменами, нами были внесены четыре направленные нуклеотидные замены, в результате которых была получена последовательность второго индикатора.

Results: Нами собрана последовательность индикатора *Voltron*, после чего на базе этой последовательности была получена последовательность индикатора Positron. Далее полученные последовательности были переклонированы в вектор, несущий гомологичные плечи локуса *Rosa26*, между которыми находится неомицинавая стоп-кассета, фланкированная сайтами *loxP*.

Заключение: В результате получены две конструкции, способные обеспечить направленную вставку в локус *Rosa26* *M. musculus* с тканеспецифичной экспрессией за счет наличия в клетках Cre-рекомбиназы, что позволяет создать мышей, на основе которых можно оценивать электрическую активность клеток головного мозга в реальном времени.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ ID 116959511.

Список литературы

1. Abdelfattah A.S., Valenti R., Zheng J. et al. A general approach to engineer positive-going eFRET voltage indicators. *Nature Communications*. 2020;11(1):3444