

Конструирование системы регуляции экспрессии генов кратковременным сигналом

Чернятина Анастасия Александровна

студентка

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: Nastiu6ka@rambler.ru

В современной биоинженерии часто требуется «включить» и «выключить» определенный ген в строго определенный момент. Это может потребоваться для наработки токсичных продуктов, селекции определенных колоний. Для выполнения этих задач требуется конструкция, способная встроить блок генов - Кассету, способную к автовырезанию под действием внешнего сигнала. В качестве исходного материала идеально подошла ДНК фага λ , способного к сайт-специфической рекомбинации в бактериальную хромосому. Такая Кассета успешно создана - суицидная плазмида, способная легко интегрироваться в бактериальную хромосому *E. coli* и автовырезаться из неё под действием индуктора – изопропил- β - D-тиогалактозида (ИПТГ).

Сайт-специфическая система фага λ : *attP*-сайт, гены *xis*, *int*, находится под контролем гибридного промотора $P_{trc-ideal-3}$. Репрессором $P_{trc-ideal-3}$ является продукт экспрессии гена *lacI*, который специально введен в Кассету, а также присутствует в хромосоме *E. Coli*, чтобы не происходило самопроизвольного, без ИПТГ, вырезания плазмиды. На начальных стадиях введения Кассеты в клетку, используется плазмида-хэлпер *pMWts-Plac-lacI*, нарабатывающая *LacI*, а затем разрушающаяся под действием температуры. Интегративная Кассета несет *ori* сайт плазмиды *R6k*, поэтому способна к репликации только в *Pig+* штамме. После трансдукции в *Pig-* штамм *E. coli*, Кассета не реплицируется.

После создания Кассеты оставалась проблема- фаг λ способен к реинтеграции, что было нежелательно. Также эксцизия Кассеты под действием индуктора происходила не всегда. Эти задачи были решены использованием системы токсин-антитоксин (ТА) бактерии *E. Coli*. В качестве токсина взят белок *MazF*, убивающий клетку хозяина. Подавить действие токсина способен белок *MazE*, в норме продуцируемый ТА системой. В Кассету вставлен ген токсина *mazF*, являющегося контр-селективным маркером. Ген *mazF* находится под контролем промотора *Parab*, этот промотор не течет (в отличие от *Plac*), т.е. токсин не проявляется в отсутствие арабинозы - положительного индуктора *Parab*. Кассета вводится в бактерию *E. coli* в присутствии плазмиды-хэлпера *pRSFsacB-Plac-lacI-mazF* (несущей ген антитоксина *mazE*). Такая система позволила производить отсев штаммов, в которых при добавлении ИПТГ не произошло автовырезания, управлять системой запуска экспрессии токсина независимо от экспрессии эксцизии.

Итак, создана Кассета, способная встраиваться и самовырезающаяся из хромосомы *E. coli* при добавлении ИПТГ. Реинтеграция кассеты и не полная эксцизия исключаются посредством действия токсина в арабинозной среде.

Литература

1. Xiao-Zhou Zhang, Xin Yan, Zhong-Li Cui, Qing Hong and Shun-Peng Li. «*MazF*, a novel conter-selectable marker for unmarked chromosomal manipulation in *Bacillus subtilis*».
2. Andreas Haldimann, Barry L. Wanner «Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval Plasmid-Host Systems for Gene Structure-Function Studies of Bacteria»
3. Shahar Amitai, Yussuf Yassin, and Hanna Engelberg-Kulka «*MazF*-Mediated Cell Death in *Escherichia coli*: a Point of No Return»