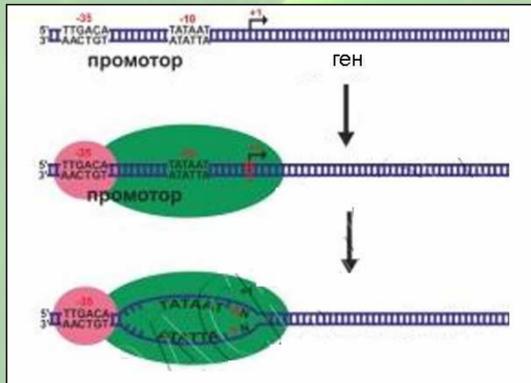


Влияние структуры промотора на экспрессию генов флуоресцирующих белков

Ирина Балыгина, Юлия Букина, Екатерина Голикова, Елизавета Горохова, Диана Павленко, Алена Попкова, Александр Сульгин, Регина Шарипова
Лаборатория генетики

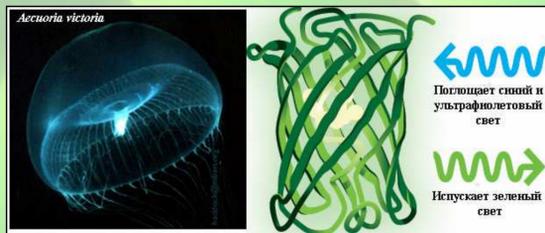
Введение:

Промотор – это участок ДНК, содержащий структурные элементы, которые распознает РНК-полимераза для начала транскрипции.



Продукт гена *ixuR* необходим для переключения метаболизма *E.coli* на альтернативные пути Эшвелла и Энтнера-Дудорова при попадании бактерий в организм хозяина. Поэтому изучение регуляции его транскрипции является интересной задачей.

Флуоресцирующий белок – это белок, который поглощает свет определенной длины волны и излучает свет другой длины волны.



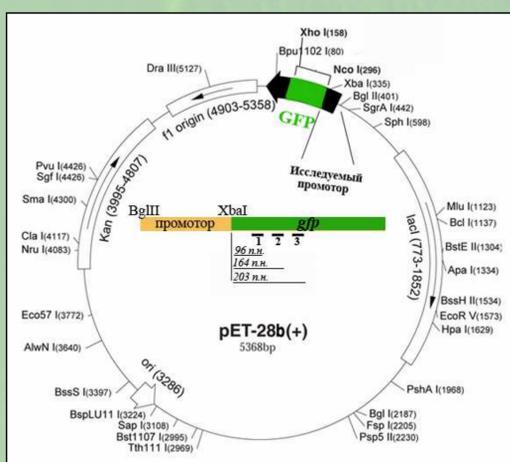
Интенсивность свечения белка используется для измерения уровня экспрессии белка в клетке.

Целью нашей работы было оценить, как структурные изменения в промоторе гена *ixuR* влияют на уровень экспрессии флуоресцирующих белков GFP – Green Fluorescent Protein – и RFP – Red Fluorescent Protein.

Методы

В работе был использован стандартный лабораторный штамм *E.coli* K12 MG1655 (номер в GenBank U00096.2). Фрагменты промоторной ДНК гена *ixuR* (-104 / +85 и -104/+90) были вставлены в вектор pET28b-eGFP или pET28b-mCherry по сайтам рестрикции Bgl II и Xba I.

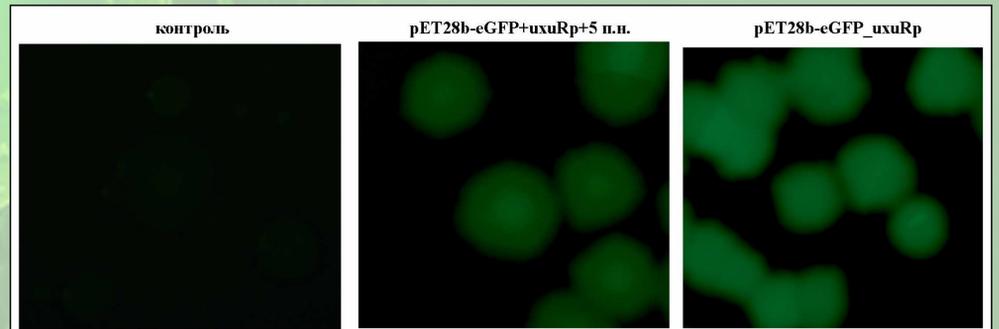
Трансформацию проводили с помощью хлорида кальция. В качестве контроля были использованы клетки, несущие аналогичные плазмиды, но лишённые промоторов. Клетки фотографировали на флуоресцентном микроскопе Leica (x2,5 объектив Leica, при длинах волн 480/510нм. Данные были обработаны с помощью программы ImageJ.



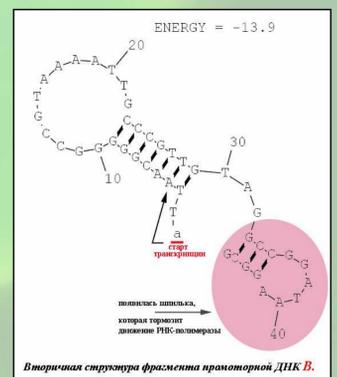
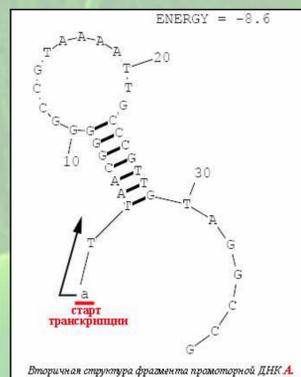
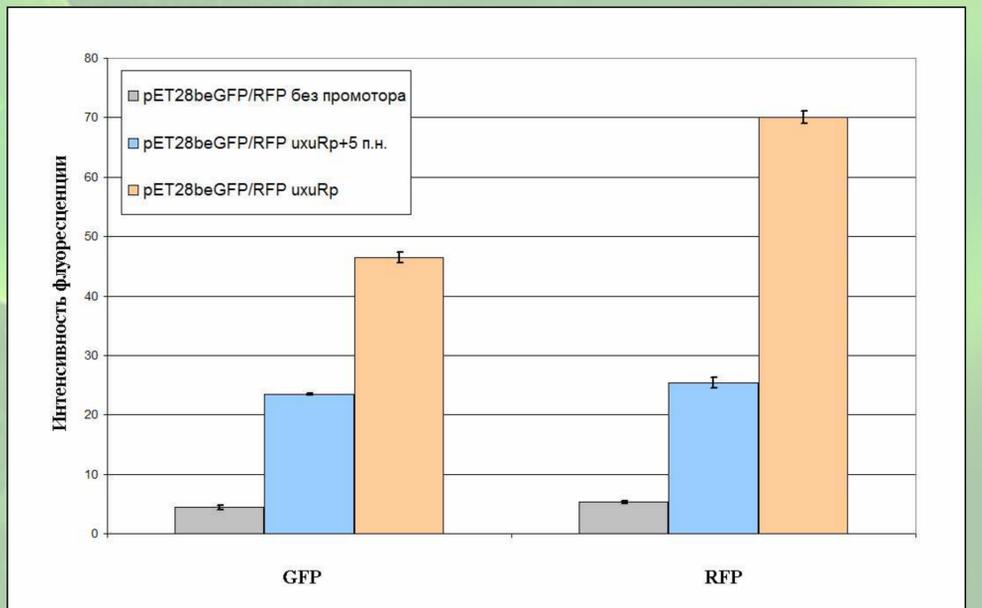
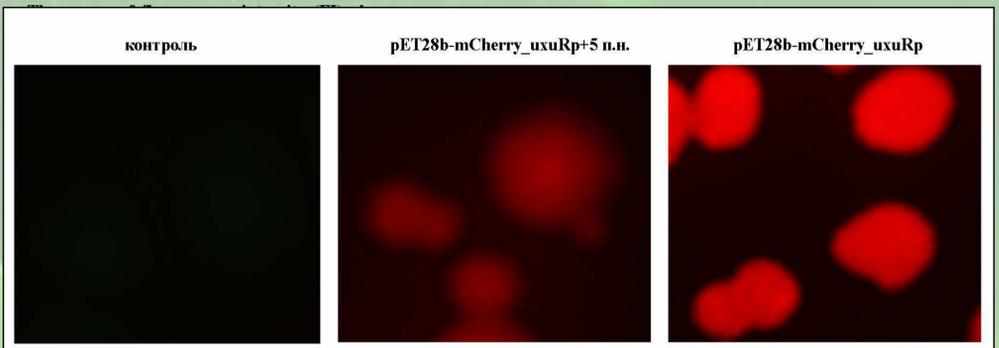
Результаты:

Был измерен уровень флуоресценции белков GFP и RFP в трех разных условиях:

1. Плазмида, лишённая промотора (pET28beGFP или pET28b-mCherry)
2. Плазмида, содержащая фрагмент промотора гена *ixuR E.coli* размером 189 п.н.
3. Плазмида, содержащая фрагмент промотора гена *ixuR E.coli* размером 194 п.н.



region remoteness (see [C]).



Выводы

- ✓ Промотор гена *ixuR E.coli* способен эффективно транскрибировать мРНК генов *gfp* и *rfp*.
- ✓ Добавление нескольких пар нуклеотидов к 3'-концу промоторного фрагмента приводит к снижению уровня транскрипции генов и уменьшению флуоресценции GFP и RFP. Это связано с образованием устойчивых вторичных структур, которые тормозят передвижение РНК-полимеразы по ДНК.