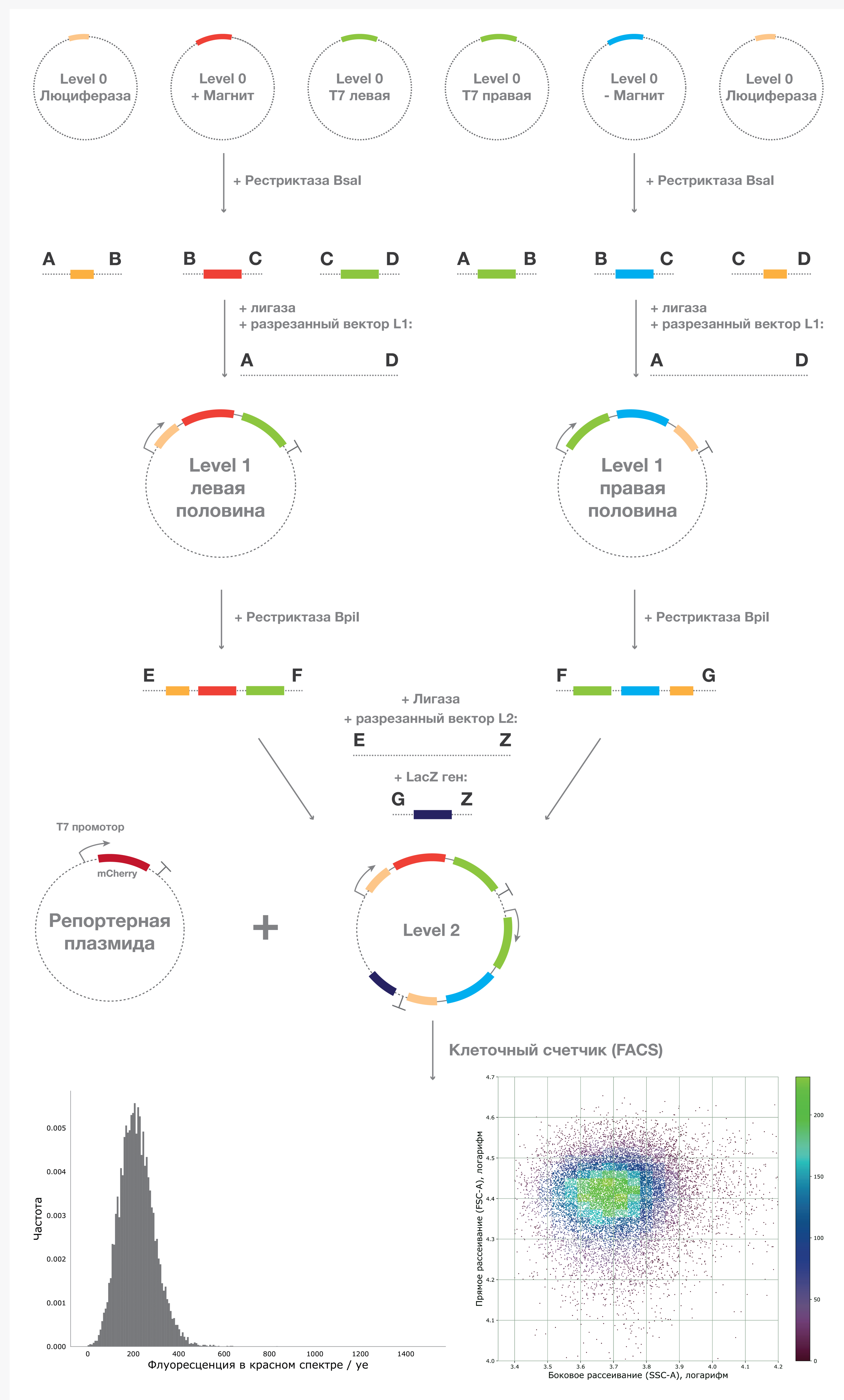
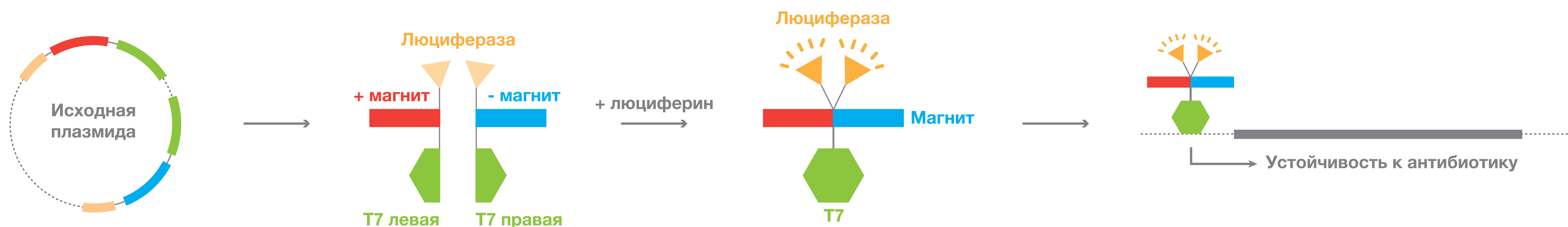


Экспрессия генов под контролем люциферазы в E. coli

Софа Безуглая*, Женя Воронова*, Даня Кренев*, Мария Минкевич*, Анна Михайлова*, Айгуль Насибуллина*, Катерина Нечаева*, Вера Соколова*, Алсу Шагиева*, Егор Антонов, Катя Путинцева, Карен Саркисян

Введение

Люциферазы широко используются как репортерные гены в биологии, будучи основой для биосенсоров, меток для микроскопии и анализов с использованием репортерных конструкций. Мы создали генетическую конструкцию, которая позволит бактериям оценивать интенсивность излучаемого ими света и изменять экспрессию выбранного маркера. Эта технология может помочь автоматически измерять яркость каждого мутанта и таким образом определять лучшие генетические варианты люциферазы без измерения вручную. Разработанный нами подход может помочь в дальнейшем исследовании природных люцифераз.



1. Сборка комбинаций генов Level-0

Плазмиды с одиночными вставками (Level-0) были выделены и собраны в разных комбинациях в левую и правую части конструкции с помощью рестриктаз, режущих ДНК на расстоянии от узнаваемого сайта. Благодаря таким рестриктазам образующиеся липкие концы не восстанавливают сайты рестрикции, поэтому рестрикция необратима. Конструкции были помещены под арабинозо-зависимый промотор и трансформированы в бактерии методом heat shock. Мы сверили длину участков с предсказанной методом ПЦР с колоний.

Результат: получены плазмиды для всех 12 вариантов половинок конструкции.

2. Объединение половинок в конечной плазмиде

Полученные плазмиды Level-1 были собраны в 36 разных финальных конструкций Level-2. Мы внесли ген LacZ в Level-2, чтобы отобрать нужные колонии по цвету.

Результат: 27 из 36 клонирований содержали вставки, 9 из них совпадали по длине с ожидаемыми.

3. Котрансформация с репортерной плазмидой

Мы трансформировали репортерную плазмиду, содержащую ген mCherry под T7 промотором, вместе с конструкциями Level 2.

В качестве **альтернативной стратегии** (не изображена на рисунке) мы планировали вставить ген GFP под T7 промотором в плазмиду вместе с нашей конструкцией. Для контроля мы трансформировали репортерный вектор с GFP в клетки, постоянно экспрессирующие T7 полимеразу, однако контрольные клетки не флуоресцировали, поэтому мы отказались от этой альтернативы.

4. Анализ флуоресценции с помощью клеточного сортера

Мы разделили суспензии бактерий на три группы: группа 1 была инкубирована в темноте, группа 2 выращивалась под постоянным облучением синим светом, группа 3 была выращена в темноте с добавлением люциферина в среду. Мы ожидали появления флуоресценции в группах 2 и 3 и отсутствия флуоресценции в группе 1.

Результат: сортировка показала отсутствие флуоресцентных клеток, связанное с тем, что репортерная конструкция не приводит к появлению флуоресценции даже при наличии функциональной T7 полимеразы.

Заключение

В ходе нашей работы мы собрали генетические конструкции и трансформировали их в E.coli вместе с репортерной плазмидой. Затем, чтобы проверить их работу, мы использовали сортировку, но не получили данных о работе собранных нами конструкций из-за нефункциональности репортерной конструкции. Собрав другую репортерную конструкцию, мы сможем повторить эксперимент и протестировать собранные нами конструкции.

* - эти авторы внесли равный вклад в работу