



# Определение возможных продуктов гена *yjjM* и их регуляторного потенциала в разных штаммах *E. coli*



Лаборатория функционального анализа белков

Балыгина И, Доморацкая Д, Закирова А, Зайцева А, Павленко Д, Прокофьева Н, Пчелинцева П, Стефанович И, Хритова Е, Шарипова Р.

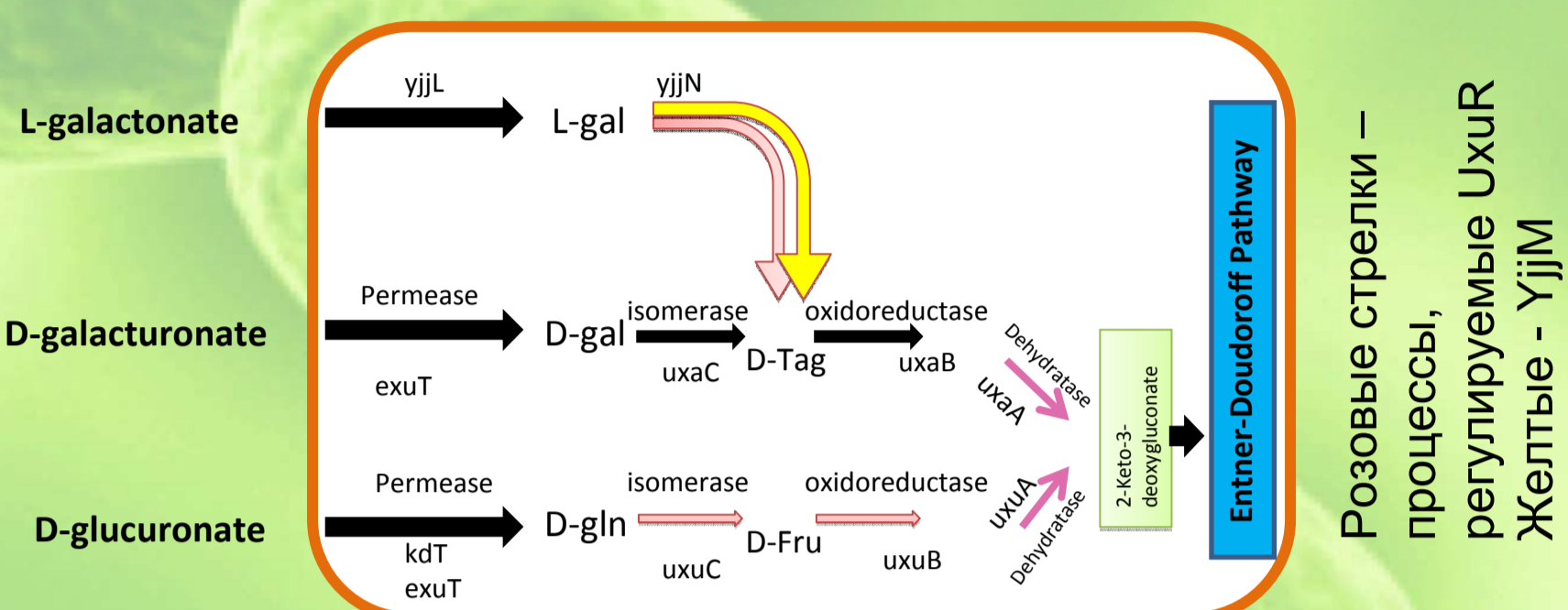
Тутукина М, Богатырева Н, Меер М, Иванков Д, Маркелова Н., Рогачевская О.

## Введение

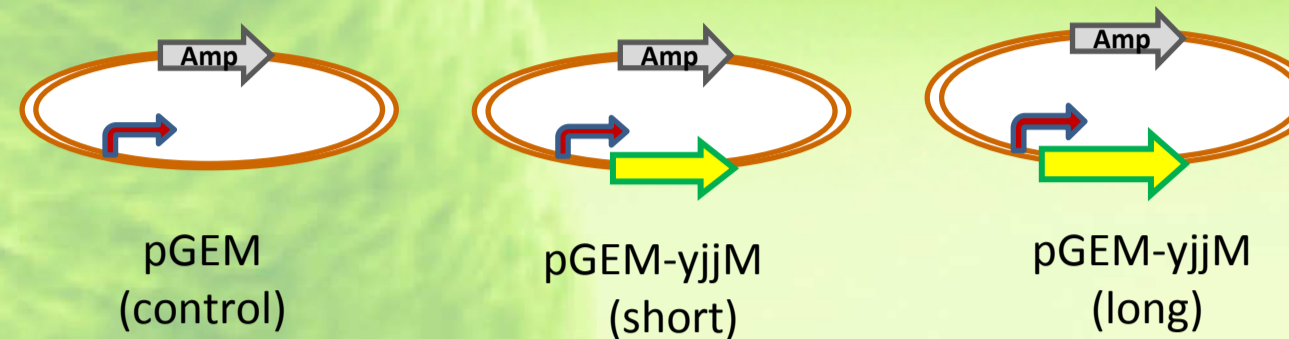
Белок *YjjM* предположительно является транскрипционным фактором, который может регулировать метаболизм сахаров.

## Схема эксперимента

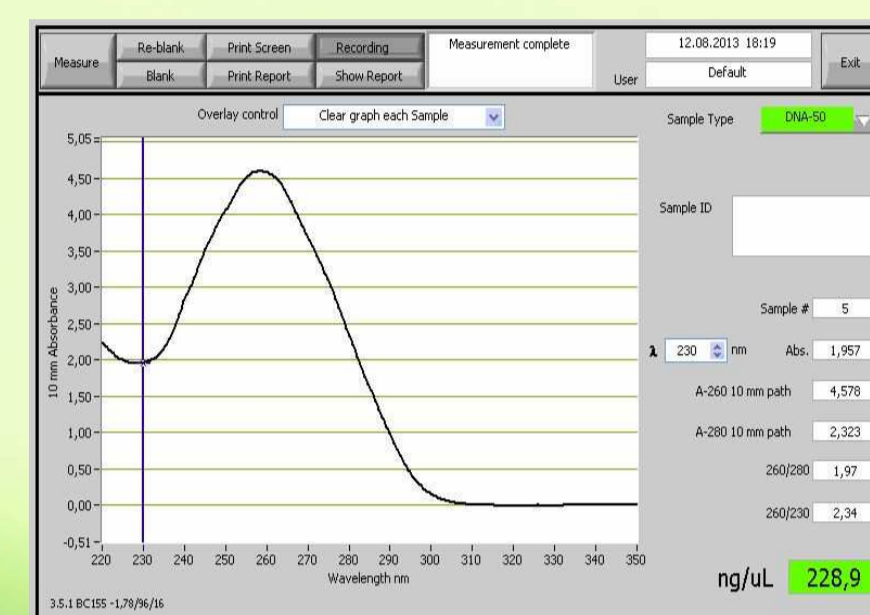
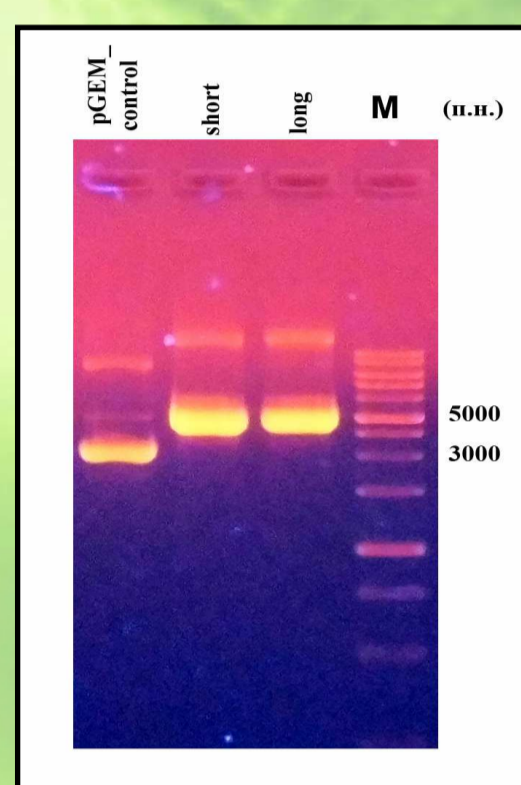
Получение плазмид и трансформация клеток



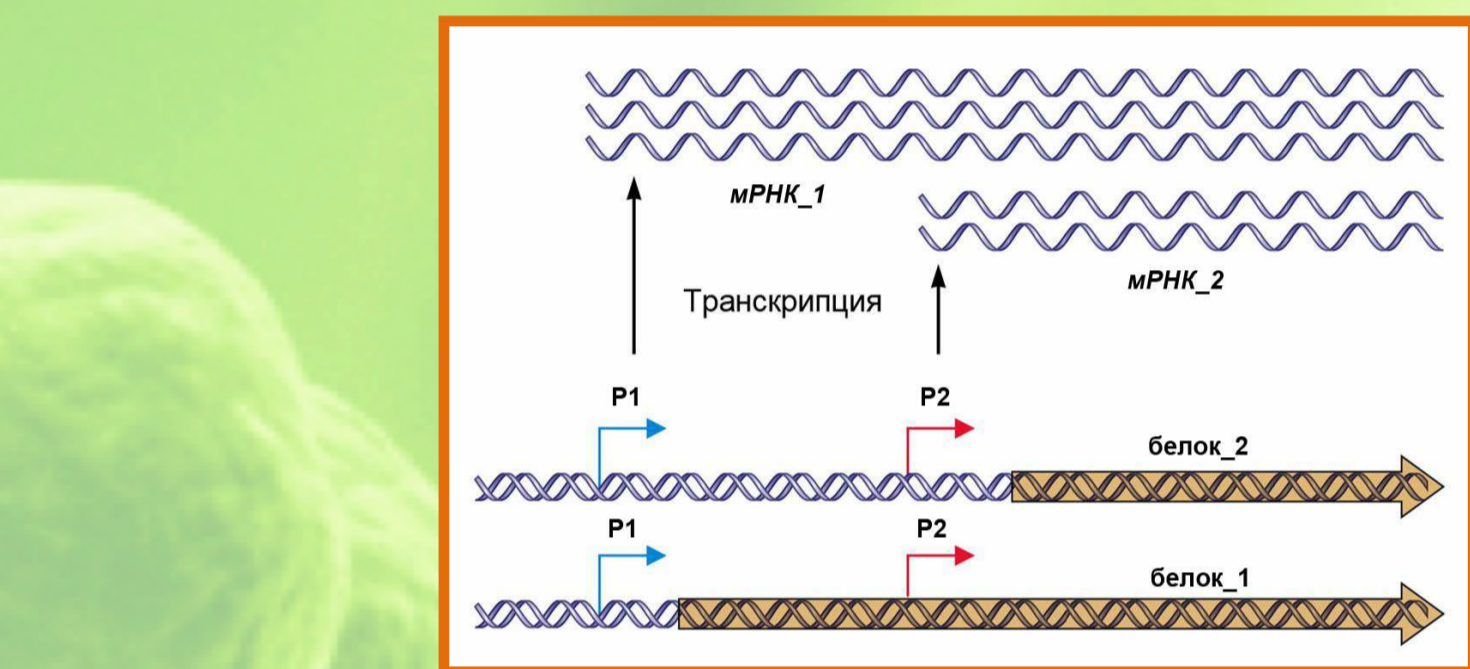
Розовые стрелки – процессы, регулируемые UxuR  
Желтые – YjjM



При анализе последовательностей гена *yjjM* было обнаружено два потенциальных старта транскрипции и трансляции с возможностью синтеза двух белковых продуктов разной длины.

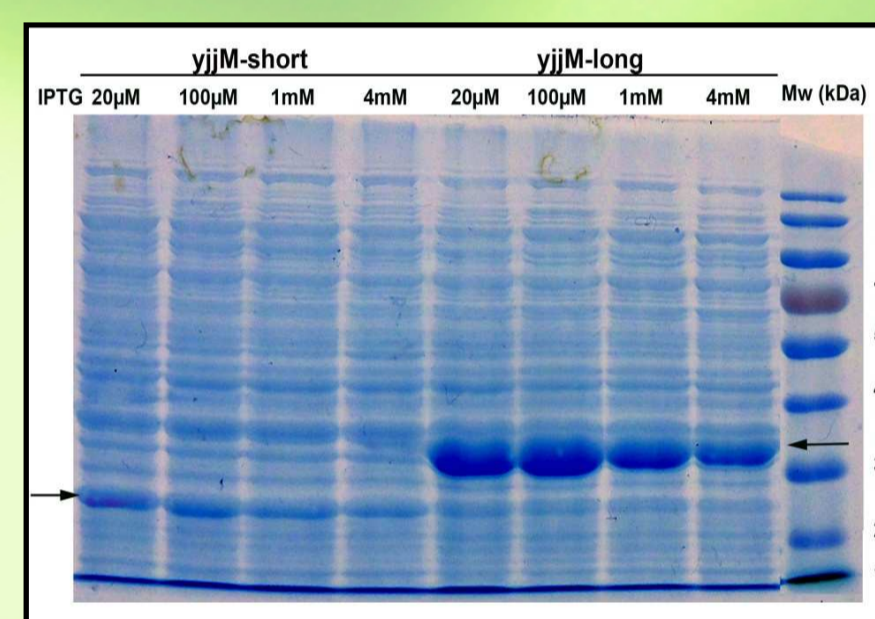
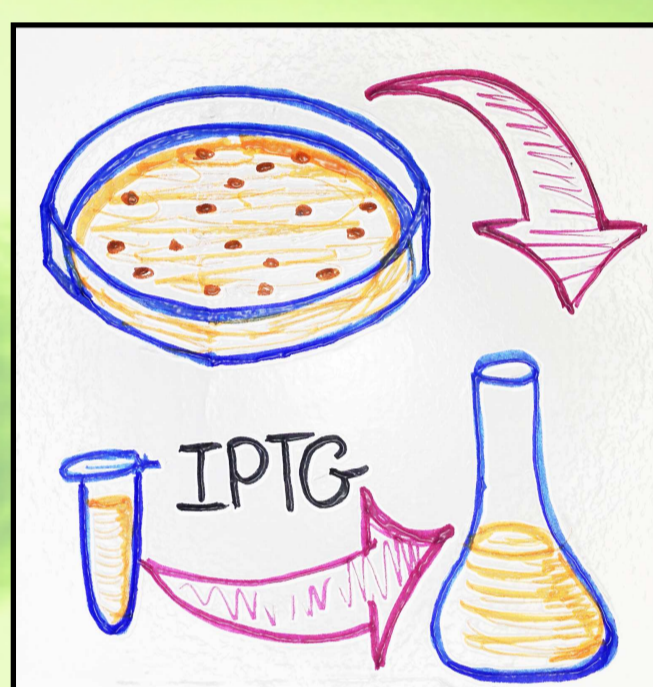


Измерение концентрации плазмид на спектрофотометре NanoDrop 1000

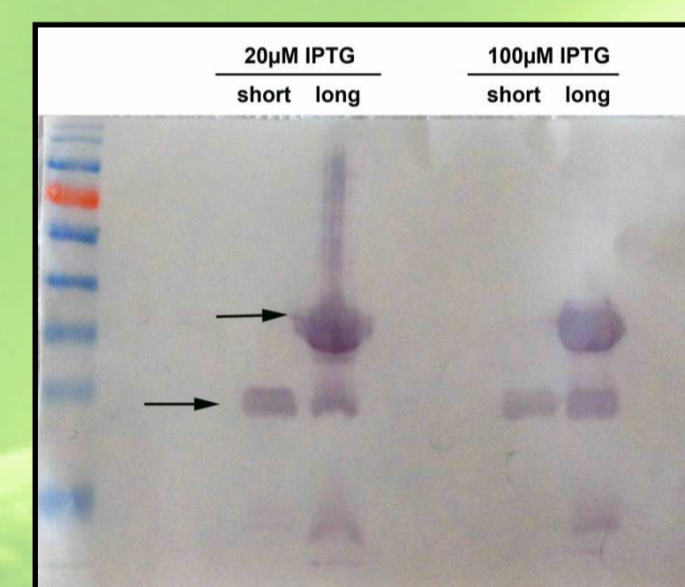


Индукция синтеза белковых продуктов гена *yjjM*

Все плазмиды были отсеквенированы по Сэнгеру для проверки вставок



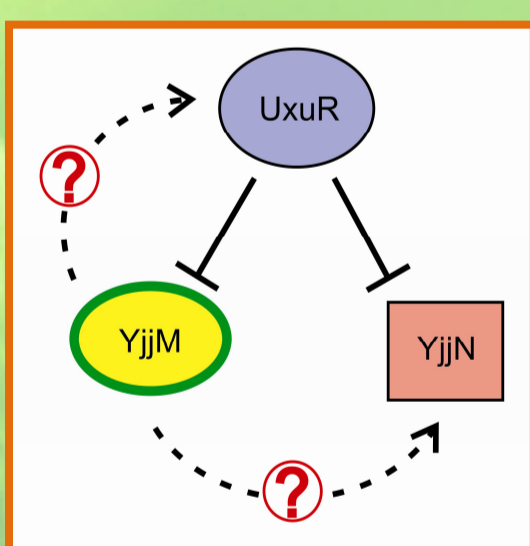
Электрофорез в 12,5% ПААГ  
Окраска Кумаси R250



Western-блот гибридизация с anti-his антителами, проявка с алкалиновой фосфатазой Western blue

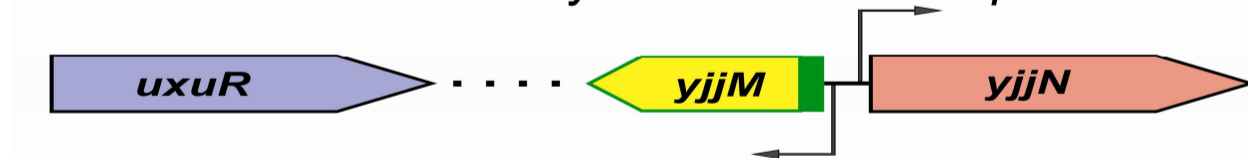
## Цель:

Установить возможность синтеза нескольких продуктов гена *yjjM* и изучить их роль в регуляции экспрессии генов сахарного метаболизма у *Escherichia coli*.



Известно, что экспрессия гена *yjjM* ингибируется белком UxuR, но непонятно, есть ли обратная связь?

Расположение исследуемых генов на хромосоме



Также интересно, есть ли такие штаммы *E. coli*, в которых есть только второй старт?

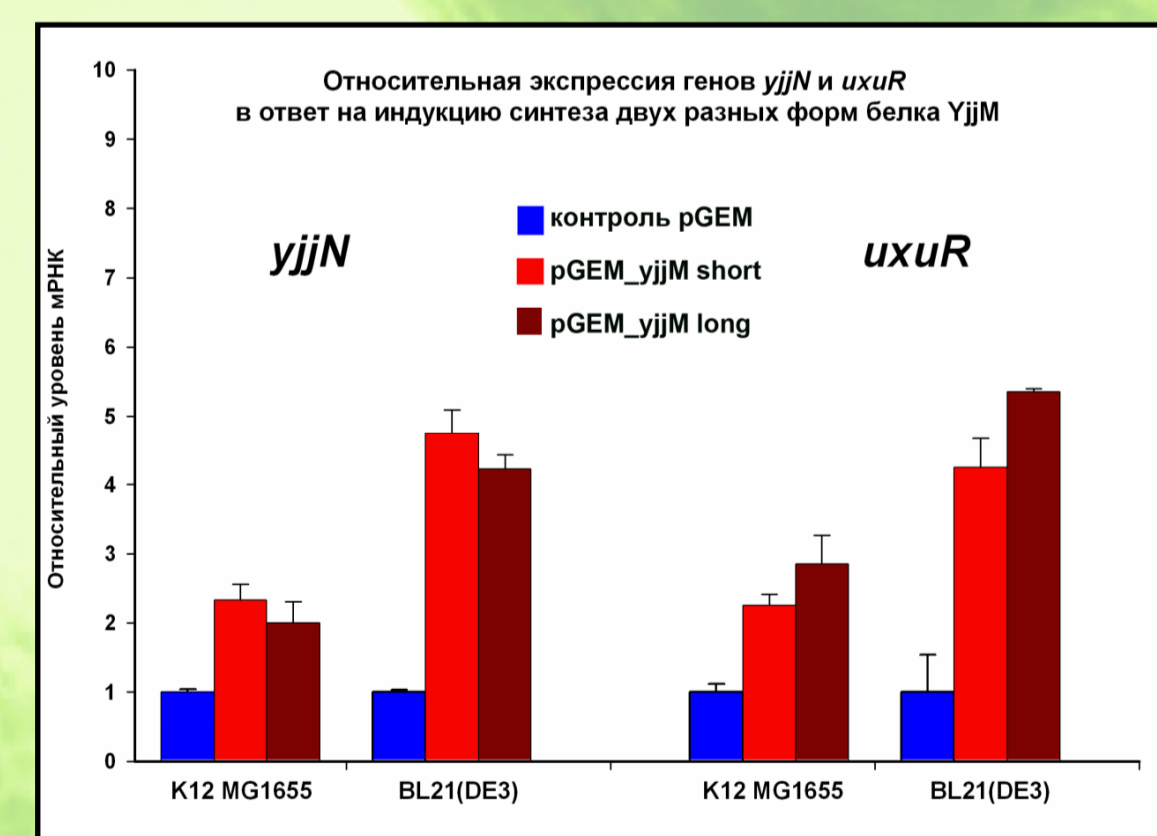
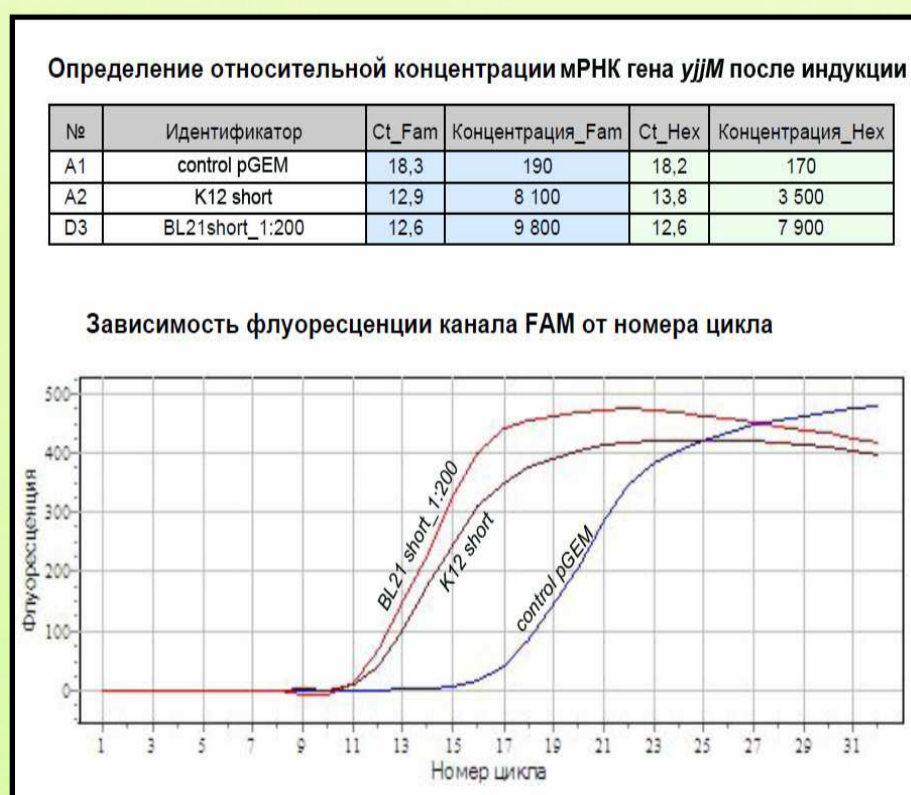
```
>yjjM
...TTTAATGGACTCACA...AAAATAGTTCGTTACAAAATTACGCGCACATGTGATTAACCAAGTCTATTGATGATATGG
CGCGGGTCAATCCCTTCCCACTCCCACTCCCAAGTCCGCGGGAATACACATC...

gb|JH709977.1|_c43000-41500      TTTAATG---GACTCACAGGAGGAAAATATGAGTCGTTACAAAATTTA
gb|AB014073.1|_c4554500-455310  TTTAATG---GACTCACAGGAGGAAAATATGAGTCGTTACAAAATTTA
gb|AI0601000091.1|_c94000-9200  TTTAATG---GACTCACAGGAGGAAAATATGAGTCGTTACAAAATTTA
g1|47118301_c5454500-5453000    TTTAATG---GACTCACAGGAGGAAAATATGAGTCGTTACAAAATTTA
g1|419167259_c91900-96300      TTTAATG---GACTCACAGGAGGAAAATATGAGTCGTTACAAAATTTA
g1|419162286_c1500-300        TTTAATG---GACTCACAGGAGGAAAATATGAGTCGTTACAAAATTTA
gb|JH945870.1|_c104000-102000  TTTAATG---GACTCACAGGAGGAAAATATGAGTCGTTACAAAATTTA
yjjM                            TTTAATG---GACTCACAGGAGGAAAATATGAGTCGTTACAAAATTTA
gb|AB014075.1|_c5185000-518350 TTTAATGCGGGACT---GGAGGAAAGATGAGTCGTTACAAAATTTA
gb|JH892598.1|_c29600-28400    TTGGGGC---GCAACAGCAGGCGGAAATAGTGGGATTCGC...
```

Множественное выравнивание начал генов *yjjM* из восьми разных штаммов *E. coli* с помощью программы Clustal. Желтым выделены два старт-кодона, серым – последовательность Шайна-Дальгарно.

В восьми из 189 проанализированных штаммов аннотированным стартом был только второй. Однако, оказалось, что это ошибка аннотации геномов.

РНК  
↓  
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ к ДНК  
↓  
ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ  
↓  
RT-PCR



Увеличение количества белка YjjM в штамме BL21 (DE3) привело к усилению активации транскрипции регулируемых генов

## Выводы

1. У *E. coli* K12 MG1655 с гена *yjjM* синтезируется два белковых продукта размером 25kDa и 35kDa с одинаковым С-концом. Это, видимо, справедливо и для других штаммов *E. coli*.
2. Обе формы YjjM являются активаторами транскрипции генов *yjjN* и *uxiR* и вовлечены в регуляцию метаболизма сахаров по пути Энтнера-Дудорова

Мы очень благодарны М.С. Гельфанду за помощь в понимании жизни факторов транскрипции и сотрудникам лаборатории Функциональной геномики ИБК РАН за терпение!