

TERMINATOR: да, нет или что?

Эмма Радионова, Дарья Репкина, Анастасия Гошина, Ярослав Лозинский,
 Виктория Покусаева, Ольга Рогачевская,
 Эдуард Валера Зорита, Гиём Филион

ВВЕДЕНИЕ

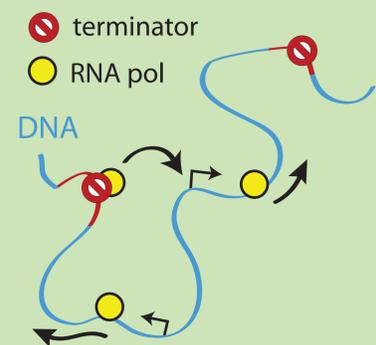
Терминатор - нуклеотидная последовательность ДНК, ответственная за прекращение транскрипции. Удивительно, но гены, искусственно встроенные в геномную ДНК дрозофилы (*Drosophila melanogaster*), имеют повышенную экспрессию если они расположились в пространстве близко к сайту терминатора транскрипции.

Гипотезы:

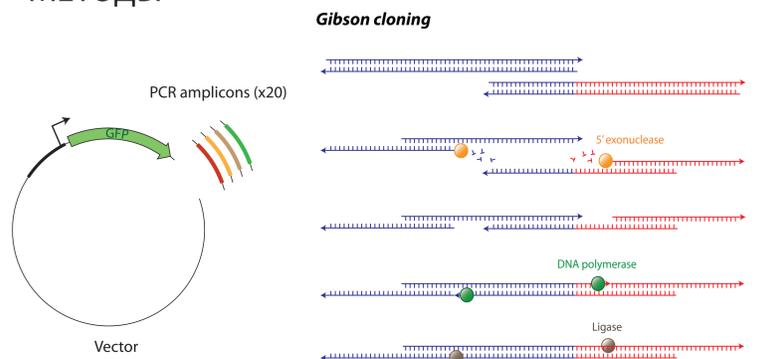
1. Терминаторы транскрипции - особые последовательности, которые активируют транскрипцию близлежащих генов подобно энхансерам.
2. Транскрипция гена увеличивается, если у промотора есть возможность использовать высвобождающийся аппарат транскрипции расположенного рядом терминатора.

Эксперимент:

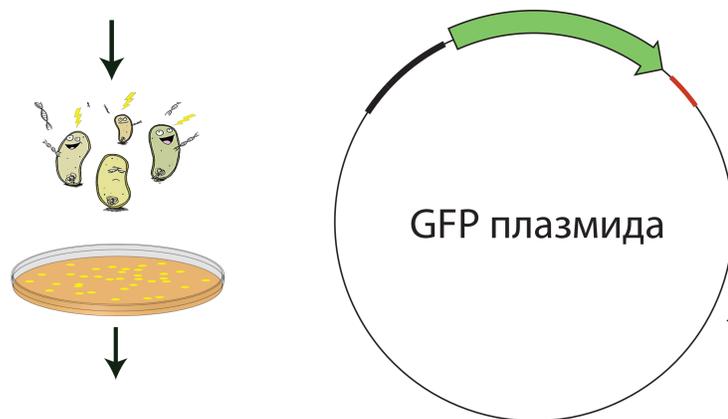
Чтобы проверить гипотезу №1, мы клонировали последовательности терминаторов в плазмиды, содержащие GFP, и оценили различия в экспрессии этого гена в линии клеток дрозофилы.



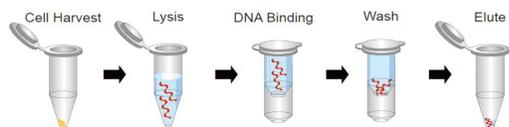
МЕТОДЫ



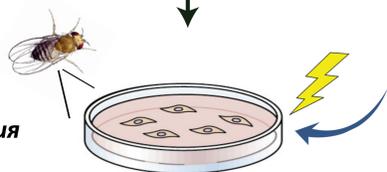
Электропорация



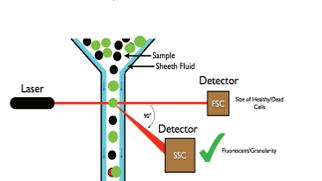
Выделение плазмиды



Электропорация



Флуоресцентная проточная цитометрия



РЕЗУЛЬТАТЫ



Рисунок 1. Амплификация терминаторных последовательностей из генома *D. melanogaster* с помощью ПЦР. Продукты реакции фракционировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

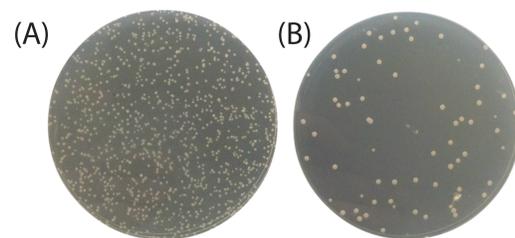


Рисунок 2. Колонии клеток *E. coli*, трансформированных продуктами реакции Гибсона (A) и линейной плазмидой, кодирующей GFP (B).

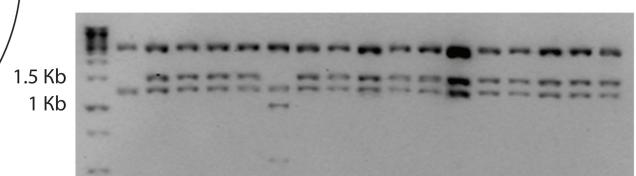


Рисунок 3. Рестрикционный анализ сконструированных плазмид. Продукты рестрикции фракционировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Расщепление плазмиды без вставки («контроль») привело к появлению трёх фрагментов с длиной приблизительно 3, 1.2 и 1.2 Кб. Расщепление плазмид со вставкой («образцы») привело к появлению фрагментов с длиной приблизительно 3, 1.5 и 1.2 Кб.

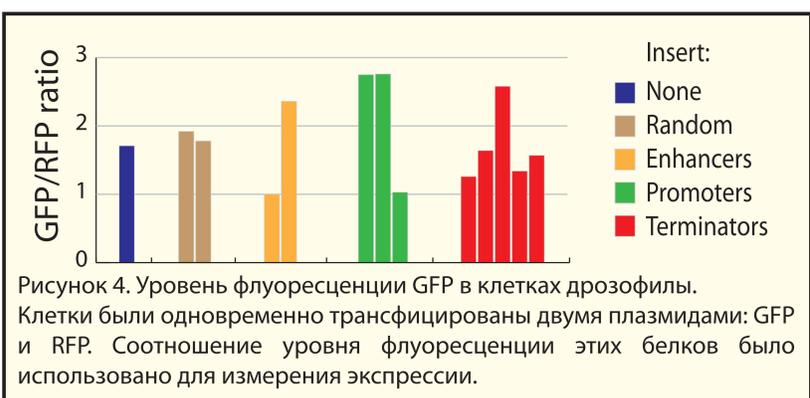


Рисунок 4. Уровень флуоресценции GFP в клетках дрозофилы. Клетки были одновременно трансфицированы двумя плазмидами: GFP и RFP. Соотношение уровня флуоресценции этих белков было использовано для измерения экспрессии.

ВЫВОДЫ

- Последовательности терминаторов не играют значительной роли в регуляции транскрипции.
- Чтобы измерить колебания уровня экспрессии и сделать статистически точное сравнение, нам необходимо провести больше повторов этого эксперимента.
- Полученные данные не дают однозначного ответа, но позволяют предположить, что терминаторы не повышают уровень транскрипции генов.