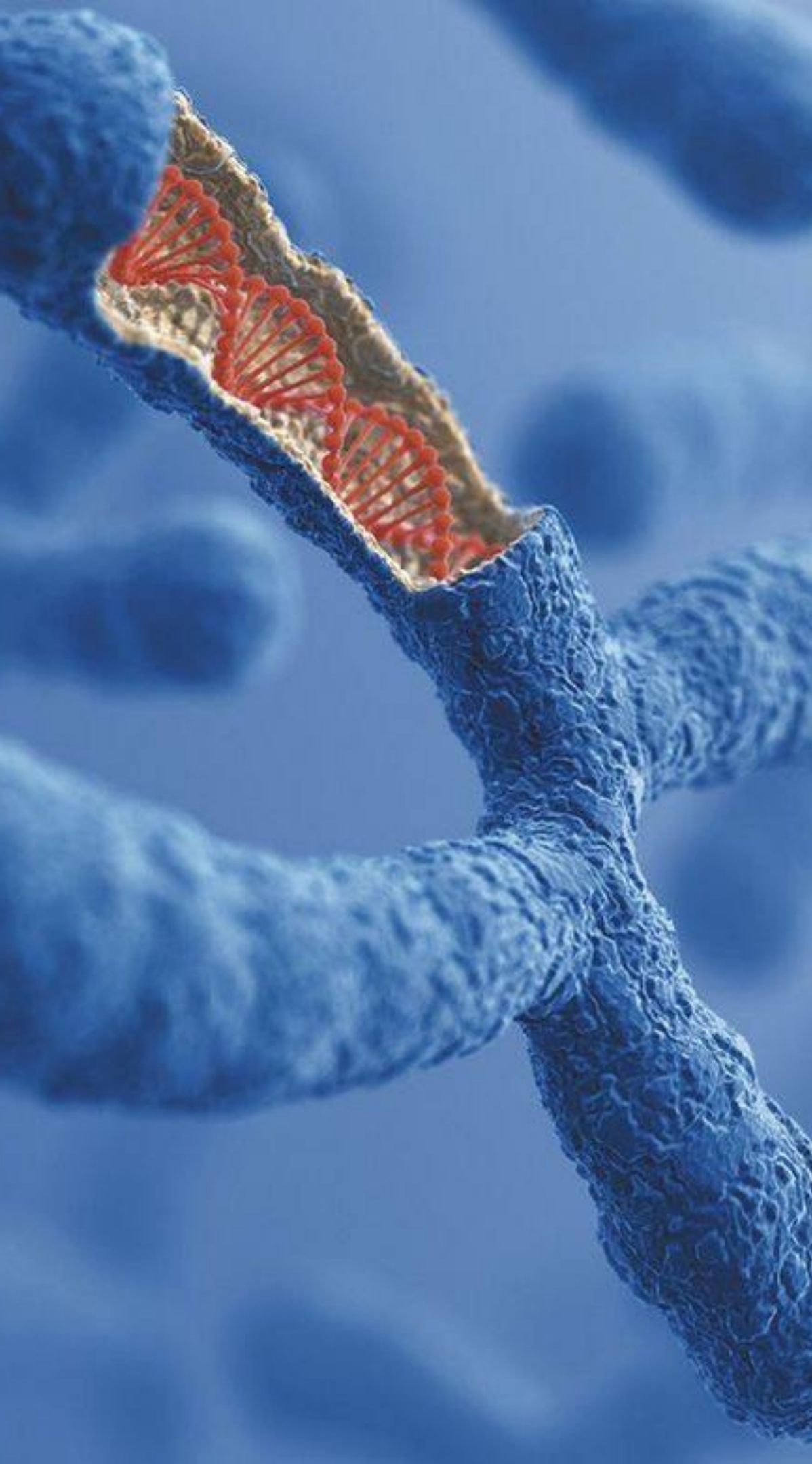


# ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПРИ УЧАСТИИ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

Satbayev University

---





---

Satbayev University

---

Основная цель экспериментов по клонированию генов, которые предполагается использовать в биотехнологии, – подбор условий для эффективной экспрессии в нужном организме-хозяине. Однако сам факт встраивания того или иного гена в клонирующий вектор ещё не означает, что этот ген будет экспрессирован. В то же время, чтобы получение коммерческого продукта было экономически оправданным, уровень его синтеза должен быть достаточно высоким.

Среди молекулярно-биологических свойств систем экспрессии наиболее важны следующие:

- 1) тип промотора и терминатора транскрипции;
- 2) прочность связывания мРНК с рибосомой;
- 3) число копий клонированного гена и его локализация (в плазмиде или в хромосоме клетки-хозяина);
- 4) конечная локализация синтезируемого продукта;
- 5) эффективность трансляции в организме хозяина;
- 6) стабильность продукта в клетке-хозяине.

Для эффективной экспрессии любого гена совершенно необходимо наличие сильного регулируемого промотора, расположенного перед данным геном. Такой промотор имеет высокое сродство к РНК-полимеразе, поэтому прилегающие к нему последовательности эффективно (с высокой частотой) транскрибируются. Регулируемость промотора позволяет клетке (и исследователю) осуществлять строгий контроль транскрипции.

Однако встраивание клонированного гена в плазмиду так, чтобы он находился под контролем постоянно функционирующего сильного промотора, не всегда приводит к оптимальной экспрессии гена. Непрерывная экспрессия чужеродного гена может оказаться губительной для клетки хозяина, поскольку приводит к истощению её энергетических ресурсов и нарушению метаболизма (метаболическая перегрузка).

Нестабильность плазмид — это есть основная проблема, мешающая получению продукта — гена, локализованного в плазмиде, — в промышленных масштабах. Для её решения нужно научиться контролировать экспрессию таким образом, чтобы клонированный ген экспрессировался только в определённой фазе клеточного цикла и только в течение определённого времени, а для этого нужно использовать сильные регулируемые промоторы.

Наиболее широко используются следующие сильные регулируемые промоторы:

- промотор *lac*-оперона *E. coli*;
- промотор *trp*-оперона *E. coli*;
- специально сконструированный *tac*-промотор, включающий (−10)-область *lac*-промотора и (−35)-область *trp*-промотора (участки, находящиеся на расстоянии 10 и 35 bp до сайта инициации транскрипции);
- левый, или  $p_L$ , промотор бактериофага  $\lambda$ ;
- промотор гена 10 бактериофага T7.

С каждым из промоторов связываются соответствующие белковые репрессоры, которые включают или выключают транскрипцию специфических генов.

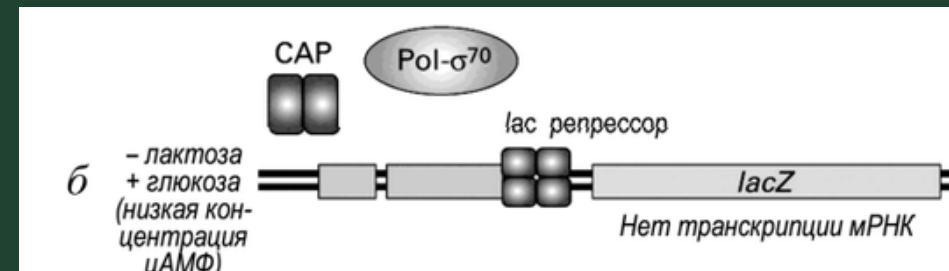
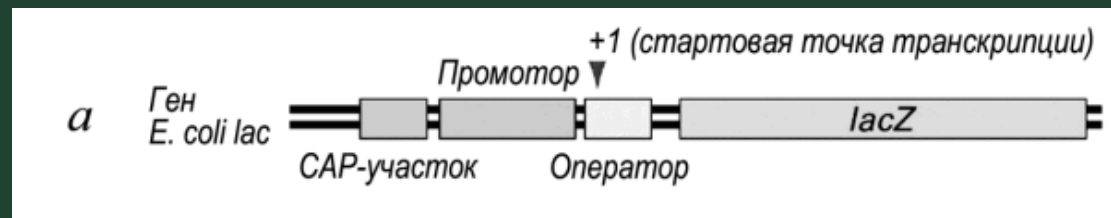
# Промотор *lac*-оперона *E. coli*.

В случае, когда в среде отсутствует лактоза, *lac*-промотор *E. coli* находится в репрессированном состоянии (он выключен белком-репрессором, который блокирует транскрипцию *lac*-оперона)

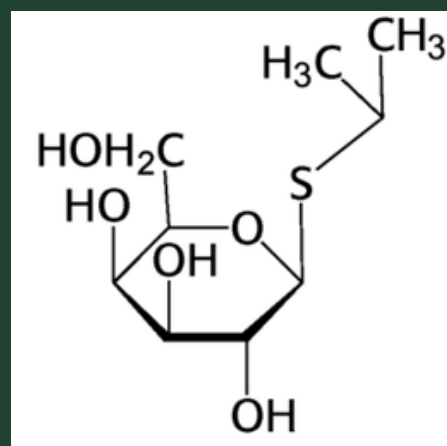
Оба этих соединения предотвращают связывание репрессора с *lac*-оператором, и транскрипция возобновляется

В свою очередь сродство CAP к промотору повышается при его связывании с циклическим аденозинмонофосфатом, цАМФ (сAMP), уровень которого повышается при снижении концентрации глюкозы в среде. Таким образом, если репрессор не связан с оператором, то в присутствии индуктора при повышении внутриклеточной концентрации сAMP может произойти усиление транскрипции генов, регулируемых *lac*-промотором.

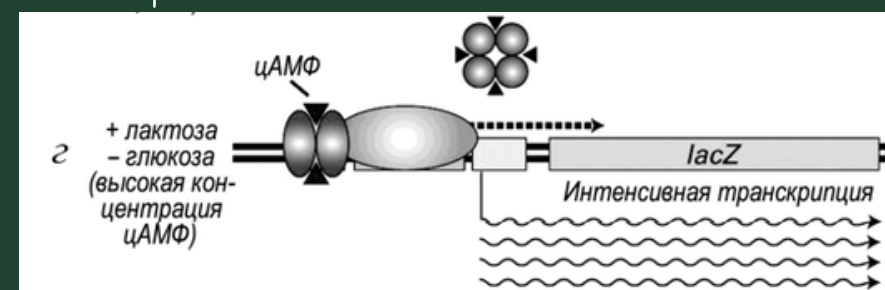
На самом деле в плазмидных экспрессирующих векторах используется один из вариантов *lac*-промотора – *lacUV5* с измененной (–10)-последовательностью, более сильный, чем *lac*-промотор дикого типа. Транскрипция с промотора *tac* также подавляется *lac*-репрессором и возобновляется при добавлении в среду лактозы или ИПТГ.



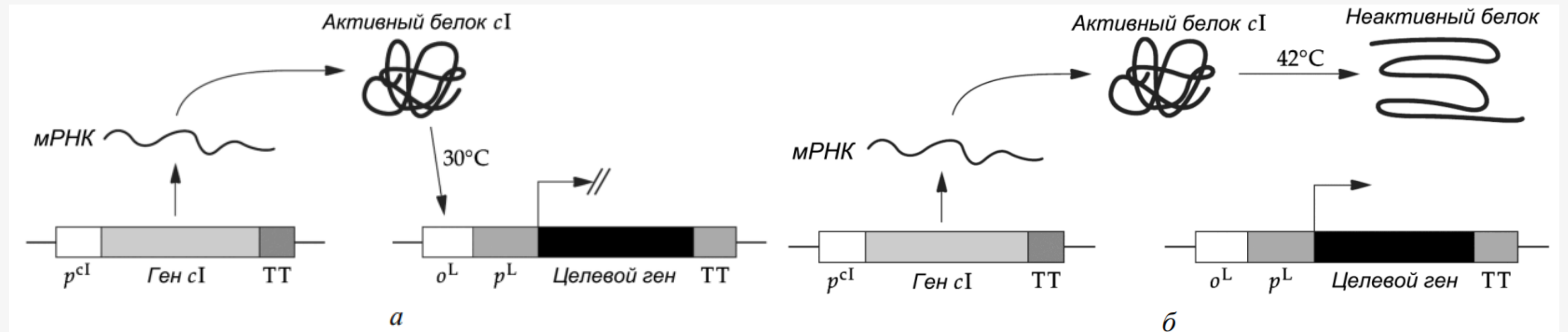
Индукция, или включение *lac*-оперона, происходит при добавлении в среду лактозы или изопропил-β-D-тиогалактопиранозида (ИПТГ).



Транскрипция, контролируемая *lac*-промотором, регулируется также с помощью белка-активатора катаболизма (catabolite activated protein, CAP). При связывании CAP с промотором повышается сродство последнего к РНК-полимеразе, и усиливается транскрипция примыкающих к нему генов



# Левый, или $p^L$ , промотор бактериофага $\lambda$ .



Работа промотора  $p^L$  регулируется репрессорным белком  $cI$  бактериофага  $\lambda$ . На практике для регуляции транскрипции с  $p^L$ -промотора обычно используется термочувствительная мутантная форма репрессора  $cI$  — белок  $cI_{857}$ . Клетки, синтезирующие этот репрессор, сначала выращивают при температуре 28–30°C; в этих условиях репрессор связывается с операторной областью  $o^L$  промотора  $p^L$  и блокирует транскрипцию с  $p^L$ -промотора.

Когда культура достигает нужной фазы температуру повышают до 42°C, при которой  $cI_{857}$ -репрессор инактивируется и начинается транскрипция.

# Промотор *trp*-оперона *E. coli*.

Промотор *trp* выключается под действием комплекса триптофан–*trp*-репрессор, который связывается с *trp*-оператором и предотвращает транскрипцию *trp*-оперона.

Активация (включение) *trp*-промотора происходит либо при удалении из среды триптофана, либо при добавлении 3-индолилукриловой кислоты.



# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

Огурцов А. Н. Молекулярная биотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты : учеб. пособие / А. Н. Огурцов. – Х. : НТУ «ХПИ», 2012. – 432 с. – На рус. яз.

