

## Конструирование транспозирующегося элемента для поиска промоторов и мутагенеза *in vitro*

Пищальникова Анастасия Владимировна

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: [bionastya@gmail.com](mailto:bionastya@gmail.com)

Несмотря на достижения биологии последних десятилетий в области исследования клеточного метаболизма, генной инженерии, определения нуклеотидных последовательностей геномов ряда организмов, даже на карте центрального метаболизма многих из них имеются «белые пятна». И одним из методов для идентификации ранее неизвестных генов является использование случайного транспозонного мутагенеза. При этом в большинстве случаев можно лишь примерно выявить места локализации интересующих генов. Поэтому было актуальным создание такого плазмидного вектора, с помощью которого можно было бы непосредственно находить промоторы, оценивать их силу, а также исследовать механизмы регуляции экспрессии генов в геноме различных организмов.

Такой транспозирующийся элемент был нами сконструирован. Он создан на основе плазмиды pGPS3 и включает в себя транспраймер, концы которого получены из транспозона Tn7, а центральную часть занимает безпромоторный ген *lacZ*, а также селективный маркер *Kan<sup>r</sup>* для удобства отбора колоний, содержащих данную плазмиду. Полученная конструкция является суицидной, то есть может реплицироваться только в Pir<sup>+</sup> штаммах, так как сконструирован на основе плазмиды R6K группы несовместимости.

При встраивании транспраймера в транслирующуюся часть гена под контроль существующего там промотора происходит экспрессия гена *lacZ*, а соответственно, наработка активной β-галактозидазы, в результате чего образуются голубые колонии на агаре, содержащем 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозид (Xgal). В дальнейшем можно выявлять месторасположение этих промоторов, а также изучать их свойства и механизмы регуляции экспрессии генов при различных воздействиях со стороны окружающей среды. В том числе, измеряя активность экспрессии *lacZ*, можно оценить силу промотора.

Встраивание транспраймера происходит стандартным для транспозона Tn7 образом посредством TnsABC\* транспозазы, которая является не эффективной при использовании целевой молекулы ДНК, уже содержащей концы Tn7, что исключает повторное встраивание транспраймера (target immunity).

Таким образом был создан удобный транспозирующийся элемент для поиска промоторов, изучения механизмов регуляции экспрессии генов и мутаций *in vitro*.

### Литература

1. Berg, C. M., Berg, D. E., Groisman, E. A. Transposable elements and the genetic engineering of bacteria // American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1989. P. 879-926
2. Biery, M. C., Stewart, F.J., Stellwagen, A.E., Raleigh, E. A., and Craig, N. L. //Nucleic Acids Res. 2000. V. 28, P. 1067-1077
3. Craig N. L. Tn7: a target site-specific transposon //Molecular Microbiology. 1991. V. 5. N.11. P.2569-2573