

Разработка и создание генетической конструкции cI/Plam_RFP на основе логического вентилля NOT

Научный руководитель – Коханенко Алина Андреевна

Мельникова Софья Андреевна

Студент (бакалавр)

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства, Томск, Россия

E-mail: sonnata03@gmail.com

Одной из наиболее актуальных задач синтетической биологии является создание генетических конструкций, позволяющих управлять экспрессией генов интереса в биологических системах. Используя подходы генной инженерии и современные методы молекулярной биологии становится возможным синтезировать генетические сети, основанные на действии логических вентилей. Молекулярный логический вентиль NOT это простейшая биохимическая схема, основанная на действии инвертора – элемента, преобразующего исходный сигнал в противоположный ему по смыслу. Целью данной работы является создание генетической конструкции cI/Plam_RFP на основе логического вентилля NOT, регулирующего в бактериальных клетках экспрессию репортнерного гена RFP в ответ на присутствие IPTG. Разработанная генетическая конструкция может быть использована для создания более сложных систем детекции, основанных на комбинированных логических вентиллях.

Генетическая конструкция cI/Plam_RFP была получена путем встраивания последовательностей генов RFP (репортнерный ген, pTurboRFP), Plam (промотор, фаг лямбда) и cI (репрессор, фаг лямбда) в экспрессионный вектор pET-15b методами рестрикции и лигирования. Методом сборки по Гибсону в рекомбинантный вектор были встроены регуляторные последовательности оператора и промотора лактозного оперона – lacO и lacP (pUC19). Работу логического вентилля проверяли путем высевания бактерий на селективную среду, содержащую индуктор IPTG.

На базе плазмиды pET-15b создан рекомбинантный вектор, несущий генетическую конструкцию cI/Plam_RFP, основанную на логическом вентиле NOT и осуществляющую детекцию IPTG в среде культивирования бактерий. В ответ на наличие селективного маркера наблюдалась репрессия репортнерного гена RFP, приводящая к прекращению флуоресцентного свечения бактерий. Для сравнения эффективности работы конструкции в зависимости от наличия или отсутствия сайта посадки рибосом (RBS) перед старт-кодоном репрессора cI были разработаны различные варианты сборки конструкции.

В настоящее время производится сравнительный анализ эффективности конструкций с учетом RBS, доработка конструкции cI/Plam_RFP и оптимизация условий экспрессии всех функциональных элементов вентилля.