

Molekulární biotechnologie

Č.5

Základní cíl biotechnologických aplikací je

- exprese klonovaného genu v hostitelské organismu (tj. vyjádření genetické informace genu v primární struktuře a funkci RNA)
- A vysoká produkce proteinu

Inserce genu do klonovacího vektoru

- Nezaručuje, že bude úspěšně exprimován

Pro docílení vysoké exprese byly zkonstruovány

- expresivní vektory
- Tyto vektory využívají genetických elementů, které kontrolují transkripci, translaci, stabilitu či sekreci proteinu

Genovou expresi a produkci proteinů lze ovlivňovat více způsoby

- 1) lze ovlivňovat charakter transkripce (promotorové sekvence a sekvence terminátoru)
- 2) iniciaci transkripce (regulovatelné promotory)
- 3) zvýšení produkce proteinu (počet kopií plasmidu nebo genů na plasmidu)
- 4) stabilitu syntetizovaného proteinu v buňce (fúzní proteiny)
- 5) sílu ribozomálního vazebného místa a účinnost translace
- 6) postranslační modifikace proteinu v hostitelském organismu
- 7) aminokyselinové složení proteinu

Každý klonovaný gen

- Má jiné vlastnosti
- Experimentálně musí být vyhledány podmínky optimální exprese pro ten který gen
- K tomu lze použít více strategií
- Strategie vypracované pro *E. coli* lze použít i u jiných organismů

Ovlivňování transkripce

- tj. přepisování genetické informace z DNA do RNA, při které DNA slouží jako matrice pro syntézu RNA katalyzovanou RNA polymerázou (DNA-dependentní RNA polymeráza, transkriptáza)

Transkripce – opakování

(Rosypal, Úvod do molekulární biologie, Brno 2003,
Základy molekulární biologie pro farmaceuty, Bartoš M. a
Bartošová L., skripta VFÚ Brno 2007, kap.4)

- Definice
- Transkripční jednotka (Obr.4.1)
- Průběh syntézy RNA (Obr.4.2)
- Transkripce u prokaryot probíhá
- ve 3 fázích (iniciace - Obr.4.3, elongace, terminace)
- Promotor – Obr.4.4
- (kapitola je umístěna u přednášek na R, název Transkripce)

Účinný systém genové exprese expresivního vektoru

- Vyžaduje silný promotor před klonovaným genem

Jako silný promotor

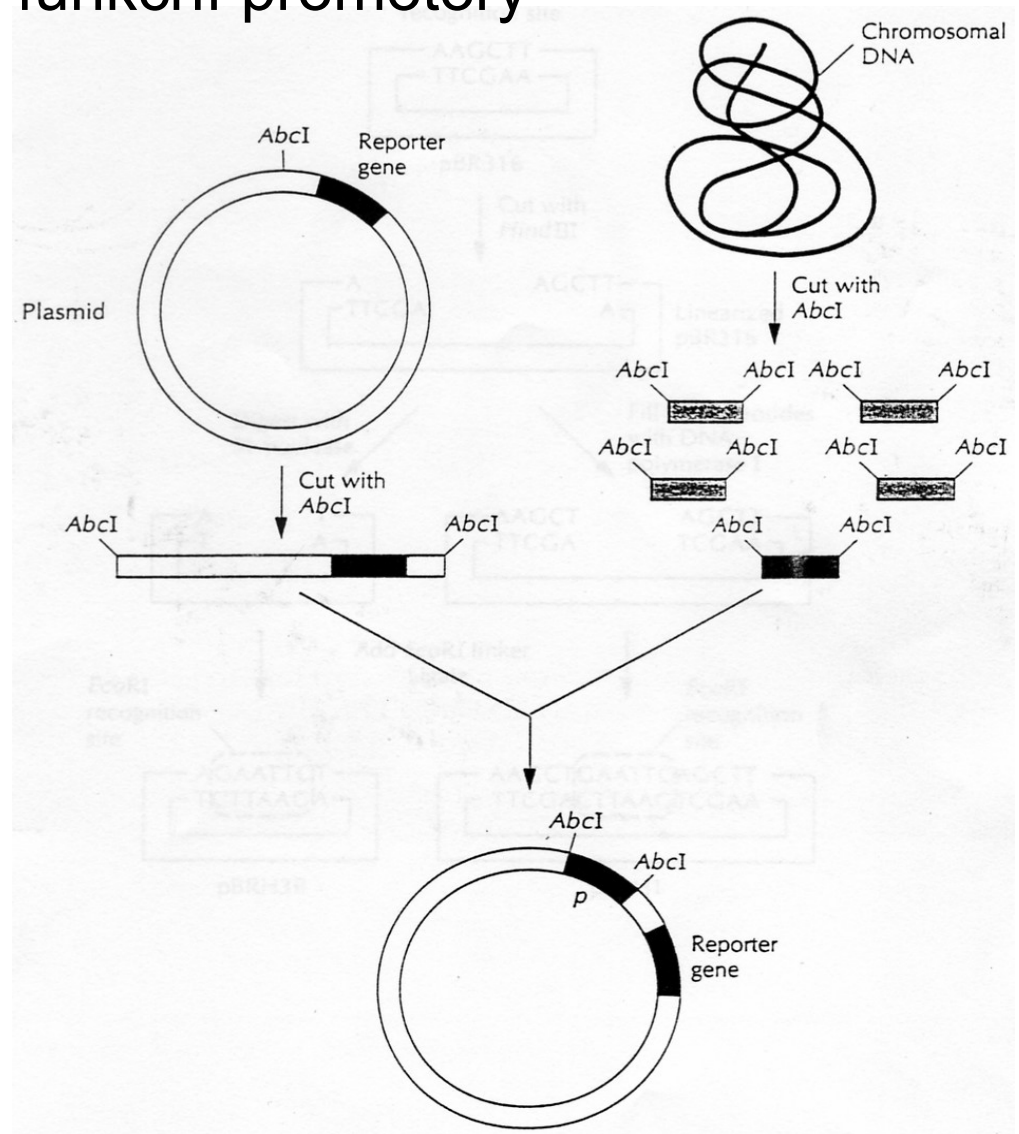
- Se využívá promotor laktóзовého operonu *E. coli*
- Lze izolovat i nové promotory
- s využitím vhodně konstruovaných vektorů (plasmidů)

Vektory pro izolaci promotorových sekvencí

- Obsahují tzv. gen zpravodaj (reportérský gen) tj.
- strukturní gen, který kóduje snadno identifikovatelný produkt
- a je začleněn bez vlastního promotoru do vektoru proti směru transkripce těsně za klonovací místo, do něhož se klonují fragmenty DNA, které nesou regulační oblasti (promotory) jiných genů
- Po přenosu rekombinantních vektorů do hostitelských buněk je exprese klonovaného strukturního genu ukazatelem funkčnosti regulační oblasti

Obečné schéma plasmidového vektoru, pomocí něhož lze izolovat funkční promotory

- Gen zpravodaj (reportérský gen): gen pro rezistenci k antibiotiku bez promotoru



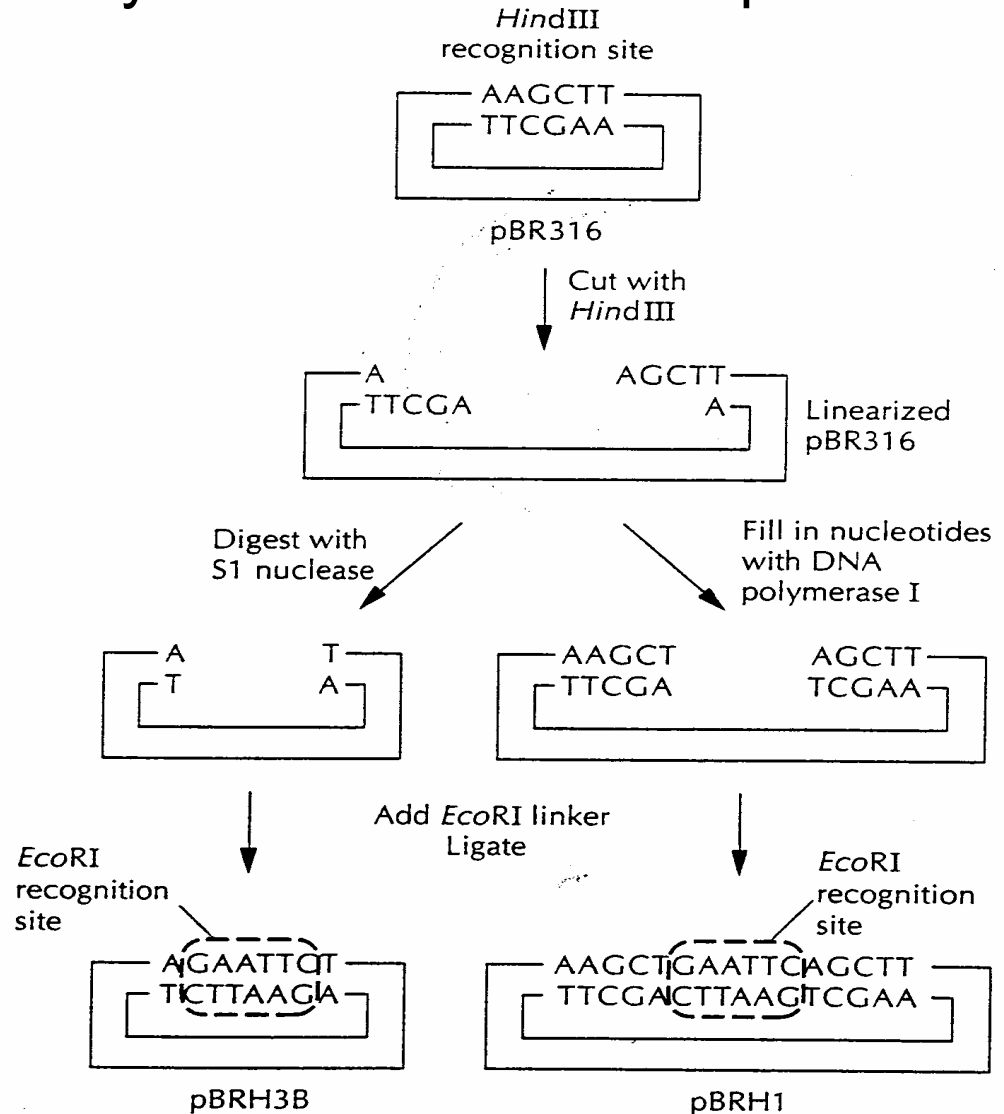


Selekce promotorů s využitím plasmidů pBR3B a pBRH1 odvozených od plasmidu pBR316

- V místě promotoru je cílové místo pro restriktázu *HindIII*
- Sekvence promotoru se naruší vložením cílového místa pro *EcoRI* (linker)
- Do *EcoRI* se klonují cizorodé fragmenty DNA
- Plasmid nese gen pro rezistenci k tetracyklinu jako selekční marker
- Rekombinantní DNA se transformuje do tetracyklin sensitive buněk
- Vysévá se na misky s tetracyklinem
- Tetracyklin rezistentní transformanty získaly promotor

Schéma plasmidů pro vyhledávání funkčních promotorů

- Plasmidy pBR316, pBRH3B a pBRH1





Plasmidy odvozené od pBR316

- Neumožňují stanovit sílu promotorů
- To je jejich nevýhoda
- Proto byly konstruovány další plasmidy, umožňující stanovit sílu promotorů

Plasmid PKO1

- Umožňuje stanovit relativní sílu promotorů
- Plasmid je stabilní a má známý počet kopií
- Nese gen pro resistenci k ampicilinu jako selekční marker
- Reportérový gen (*galK+*) bez promotoru kóduje galaktózokinázu (gen, jehož produkt lze snadno stanovit)
- Těsně před ním se nachází klonovací místo (cílové místo pro restriktázu *SmaI*) a translační stop kodony ve všech 3 čtecích rámcích (ts) (k translaci nemůže dojít z klonované DNA)
- Konstrukt vektor-cizorodá DNA se transformuje do buněk ampicilin sensitivních a *galK-* (neschopných syntetizovat galaktózokinázu)
- Vysévá se na misky s McConkey agarem, galaktózou (jediný zdroj C) a ampicilinem
- Když dochází k fermentaci galaktózy (díky přítomnosti funkční galaktózokinázy), rostou červené kolonie
- Když nedochází k fermentaci galaktózy, rostou krémově zbarvené kolonie

Schéma plasmidu pKO1

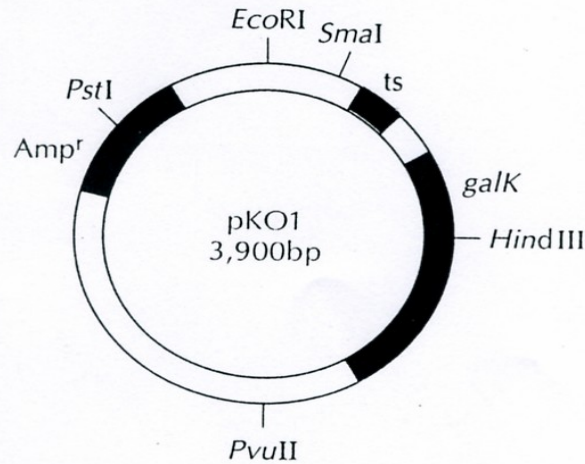


Table 4.1 The effect of transcription promoters and terminators on colony color, growth, and galactose kinase activity units of cells transformed with plasmid pKO1.

Promoter	Terminator	Color	Growth	<i>galK</i> activity
None	None	Cream	Good	None
<i>Plam</i>	None	Red	Poor	2,400
<i>Plam</i>	<i>Tlam</i>	Red	Good	50
<i>Pgal</i>	None	Red	Good	680
<i>Pgal</i>	<i>Tlam</i>	Cream	Good	12

Adapted from Rosenberg et al. 1983. *Science* 222:734-739.



Vliv různě silných promotorů a terminátorů na růst a zabarvení kolonií a na aktivitu galaktózokinázy u transformantů nesoucích plasmid pKO1

Table 4.1 The effect of transcription promoters and terminators on colony color, growth, and galactose kinase activity units of cells transformed with plasmid pKO1.

Promoter	Terminator	Color	Growth	<i>galK</i> activity
None	None	Cream	Good	None
<i>Plam</i>	None	Red	Poor	2,400
<i>Plam</i>	<i>Tlam</i>	Red	Good	50
<i>Pgal</i>	None	Red	Good	680
<i>Pgal</i>	<i>Tlam</i>	Cream	Good	12

Adapted from Rosenberg et al. 1983. *Science* 222:734–739.



Genová exprese klonovaného genu neseného na plasmidu pod kontrolou kontinuálně transkribovaného silného promotoru

- Vede ke spotřebě energie
- Poškozuje esenciální funkce buňky (růst)
- Plasmid bývá nestabilní
- Proto jsou v klonovacích vektorech využívány regulovatelné promotory

