

Элемент *hok/sok* как фактор увеличения уровня биосинтеза аспарагиназы при использовании плазмиды pET28e

Хасанов Данила Сергеевич

Студент (бакалавр)

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина, Москва, Россия
E-mail: oovizorooo@gmail.com

Одним из распространенных вариантов системы сегрегационной стабилизации является структура токсин-антитоксин. Системы токсин-антитоксин первого типа включают в себя генетический элемент *hok/sok*, выделенный из природной плазмиды *E.coli* R1. В элементе *hok/sok* ген *hok* кодирует долгоживущий токсичный полипептид, а *sok* является короткоживущей антисмысловой РНК, блокирующей трансляцию гена *hok*[1]. В различных исследованиях позиция и ориентация элемента *hok/sok* относительно промотора целевого гена в составе плазмиды оказывались различной. Мы предположили, что действие *hok/sok* и его токсический эффект в отношении клеток-хозяев может различаться в зависимости от положения и ориентации элемента. Эта гипотеза была исследована для штамма *E.coli* BL21[DE3], векторной плазмиды pET28a с геном устойчивости к канамицину, а также малотоксичного для *E.coli* гена аспарагиназы [2]. Аспарагиназа используется как химиотерапевтический препарат, используемый при лечении острого лимфобластного лейкоза и родственных патологий. Были получены три варианта плазмид с элементом *hok/sok* - расположенном после терминатора транскрипции целевого гена, рамка считывания *Hok* на плюс-цепи (HD), в той же позиции, но на минус-цепи (HR), а также перед промотором целевого гена; *Hok* на минус-цепи (HU). Для проверки сегрегационной стабильности полученных плазмид использовали периодическое культивирование штаммов в жидкой среде без антибиотика в присутствии индуктора - 1 mM IPTG. Все три варианта плазмиды с элементом *hok/sok* сохранялись у более чем 75% клеток после трех дней культивации, т.е. шести пересевов, а контрольная плазида без элемента *hok/sok* - у менее чем 1% клеток. При измерении содержания аспарагиназы в клетках, установлено, что оно составляет после первого дня pET28a - 1,3 мг/л, HD - 43,5 мг/л, HDR - 22,75 мг/л, HU - 9 мг/л, но изменяется, и существенно снижается для HD и HDR после третьего дня - для pET28a 1,75 мг/л, HD - 7,5 мг/л, HDR - 11 мг/л, HU - 14 мг/л. Мы предположили, что такое падение уровня целевого белка при сохранении клетками плазмиды может быть следствием мутаций в клетках. Для трех канамицин-устойчивых колоний с плазмидой HD, высеянных на твердую среду после третьего дня культивации, было обнаружено, что выделенные из них плазмиды после трансформации в клетки BL21[DE3] кодируют ферментативно активную аспарагиназу и скорость ее накопления соответствует исходной. В результате, было установлено, что наибольшей стабильностью и продуктивностью обладают HD и HDR; HU обладает меньшей продуктивностью, а pET28 выпадает из клеток быстрее всего. Таким образом, позиция, но не ориентация, элемента *hok/sok* в плазмиде влияет на уровень биосинтеза целевого белка при культивации без антибиотика.

Источники и литература

- 1) (RU2496877C2) Плазмидный вектор pHYP с повышенной сегрегационной стабильностью для экспрессии рекомбинантного белка – Орлова Н.А., Воробьев И.И.
- 2) The *parB* (*hok/sok*) Locus of Plasmid R1: A General Purpose Plasmid Stabilization System. *Nature Biotechnology* 6, 1402 – 1405 (1988)