

Конструирование биосенсора окислительного стресса на основе клеток *Escherichia coli* с использованием гибридной плазмиды, содержащей lux-оперон и индуцируемый стрессовый промотор.

С.В. Баженов¹, И.В. Манухов¹

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

Лух-биосенсоры широко используются в работах по биотехнологии и генетической инженерии, при тестировании новых лекарственных препаратов и мониторинге окружающей среды (в качестве детекторов токсических агентов). Лух-биосенсор – это бактериальная клетка, содержащая гибридную плазмиду, в состав которой входят регуляторный участок (индуцируемый промотор или оператор) и ген(ы)-репортер(ы). Целью данной работы является создание лух-биосенсора с индуцируемым промотором оперона *iscRSUA E.coli* K12 MG1655, который кодирует белки, участвующие в биосинтезе Fe-S кластеров. В качестве репортеров используются гены *luxCDABE Photorhabdus luminescens*, кодирующие бактериальные люциферазу и редуктазу, а в качестве регуляторного элемента — индуцируемый промотор, изолированный из оперона *iscRSUA*. Белок IscR кодируется первым геном *iscR* оперона *iscRSUA* и является репрессором транскрипции с промотора оперона *iscRSUA* [1]. Индукторами данного промотора являются перекись водорода и паракват (1,1'-диметил-4,4'-дипиридилий дихлорид).

В ходе работы был получен фрагмент ДНК, содержащий промотор P_{iscR} оперона *iscRSUA* методом ПЦР-амплификации из генома *E.coli* K12 MG1655. ПЦР-продукты встраивали в вектор pTZ57R (Т-вектор). Далее проводился отбор гибридных плазмид по ориентации вставки. После чего участок ДНК, содержащий данную вставку в правильной ориентации, вырезался из Т-вектора по сайтам рестрикции EcoRI-BamHI и встраивался в беспромоторную плазмиду pDeW201 [2]. В результате была получена гибридная плазида pIsc-lux, в которой гены *luxCDABE P.luminescens* расположены под контролем индуцируемого промотора оперона *iscRSUA* рис.1.

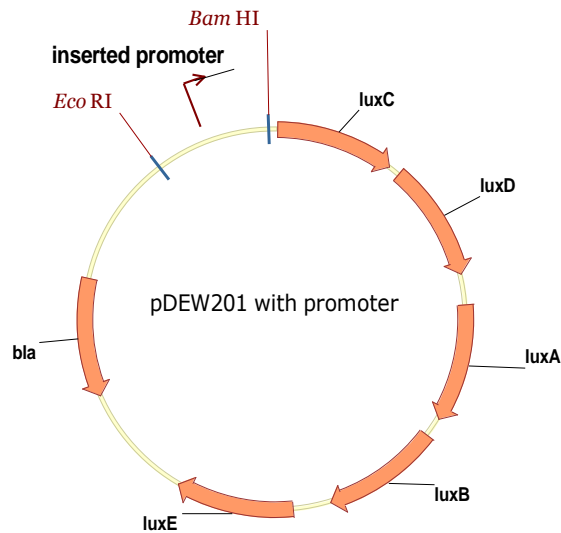


Рис. 1. Схема плазмиды pDEW201 со встроенным промотором.

Были проведены измерения биолюминесценции клеток *E. coli* штамма MC1061, трансформированных плазмидой pIsc-lux, при различном содержании параквата и перекиси водорода в качестве индукторов рис. 2, рис. 3.

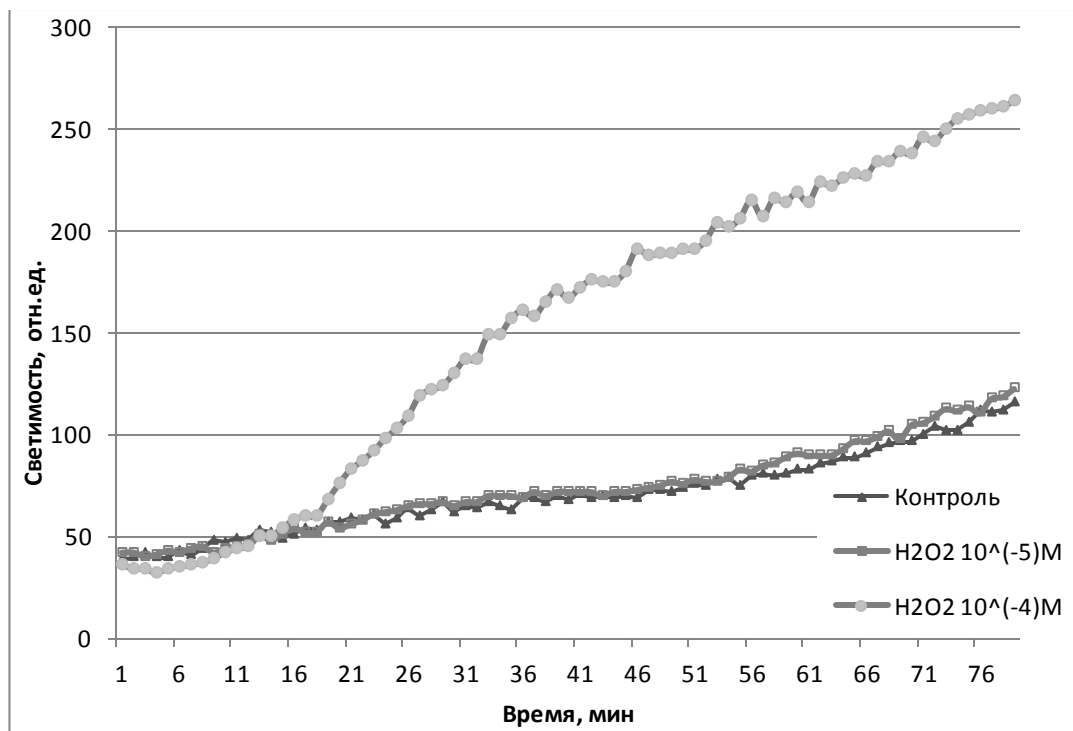


Рис. 2. Зависимость люминесценции биосенсора *E. coli* MG1061 pIsc-lux от времени в присутствии перекиси водорода в среде

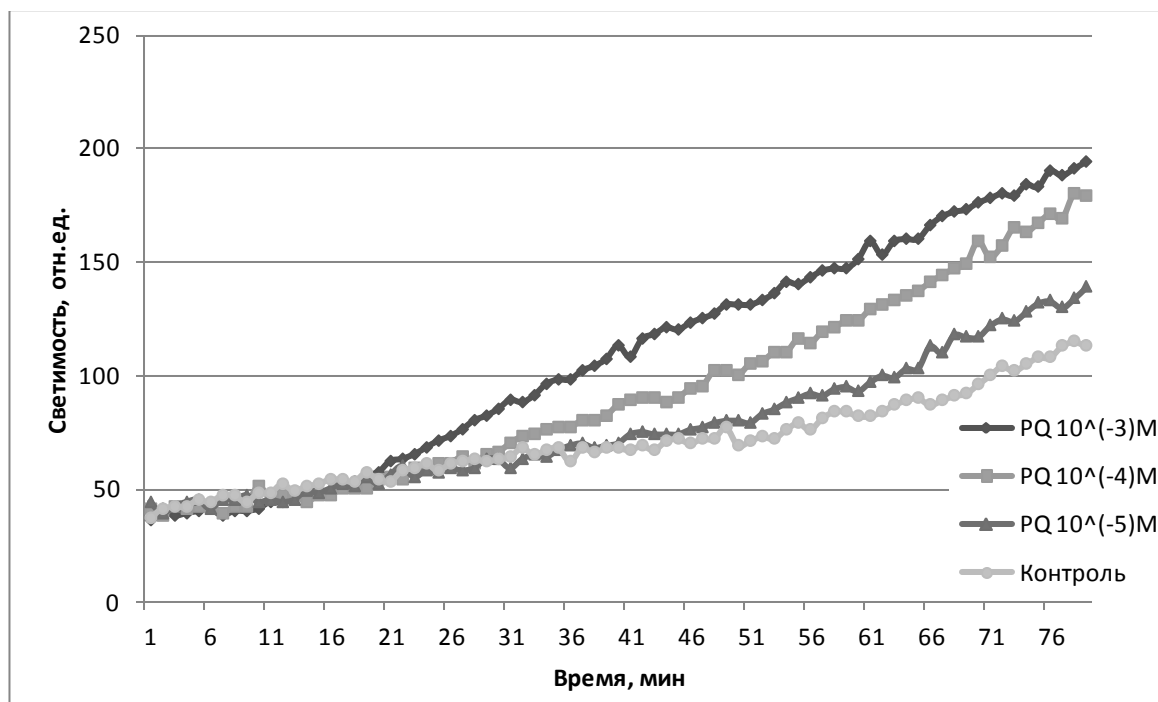


Рис. 3. Зависимость люминесценции биосенсора *E. coli* MC1061 pIsc-lux от времени в присутствии параквата в среде.

Сконструированный в настоящей работе биосенсор для детекции окислительного стресса с промотором P_{iscR} чувствителен к перекиси водорода и параквату, стимулирующему формирование в клетке супероксид-анион радикала. Пороговая чувствительность биосенсора pIsc-lux к перекиси водорода составляет около $5 \times 10^{-5} \text{M}$, что примерно в 100 раз превышает внутриклеточную концентрацию перекиси водорода ($5 \times 10^{-7} \text{M}$), формирующегося в процессе дыхания. Сконструированные ранее биосенсоры для детекции окислительного стресса с промоторами PkatG и PsoxS специфично чувствуют появление в среде перекиси водорода параквата соответственно. Полученный в настоящей работе биосенсор с использованием промотора P_{iscR} является универсальным к любым активным формам кислорода, способным окислять Fe-S кластеры в клетке.

Литература:

1. Schwartz CJ, Giel JL, Patschkowski T, et al. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, vol. 98, no. 26, pp. 14895–14900.
2. Van Dyk TK, Rosson RA. Photorehabilitation of *luxCDABE* promoter probe vectors. *Methods Mol. Biol.*, 1998, 102:85–95.

З. В. Ю. Котова, И. В. Манухов, Г. Б. Завильгельский “lux-биосенсоры для детекции ответа, «теплового шока» и окислительного стресса”. Биотехнология, 2009, №6 16-25