

# Molekulární biotechnologie č.6

## Zvýšení produkce proteinu

- Další postupy vedoucí ke zvýšení produkce proteinu

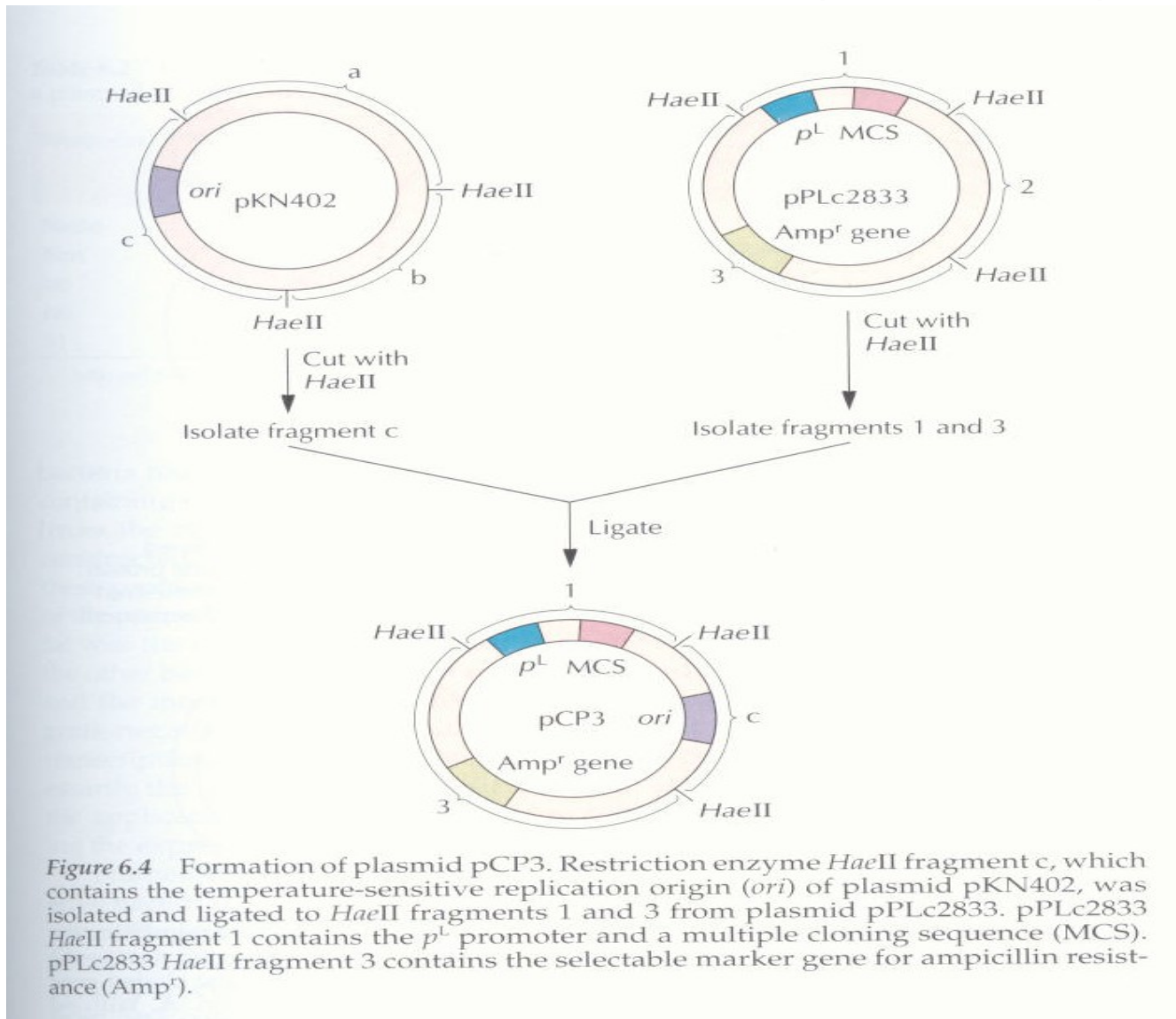
## Zvýšení produkce proteinu lze docílit zvýšením počtu kopií plasmidu

- Byl konstruován plasmid-chiméra pCP3
- Z jednoho plasmidu má fragment c (teplotně sensitivní počátek replikace)
- Z druhého plasmidu má fragment 1 se selektivním markerem (gen pro rezistenci na ampicilin) a
- fragment 3 s regulovatelným pL promotorem a mnohočetným klonovacím místem (pro vložení klonovaného genu)
- V buňkách *E. coli* je lokalizován gen Clts857 kódující teplotně sensitivní represor

## Vliv teploty na počet kopií plasmidu

- Tab.4.2 Plasmid pCP3 tvoří při nízké teplotě (28 C) 60 kopií/buňku
- A při vysoké teplotě (42 C) 713 kopií na buňku
- Při 42 C se syntetizuje neaktivní represor a díky tomu dochází k transkripci klonovaného genu z promotoru PL regulovaného represorem Clts857

# Konstrukce plasmidu pCP3 (Glick 2003)



**Figure 6.4** Formation of plasmid pCP3. Restriction enzyme *Hae*II fragment c, which contains the temperature-sensitive replication origin (*ori*) of plasmid pKN402, was isolated and ligated to *Hae*II fragments 1 and 3 from plasmid pPLc2833. pPLc2833 *Hae*II fragment 1 contains the *p<sup>L</sup>* promoter and a multiple cloning sequence (MCS). pPLc2833 *Hae*II fragment 3 contains the selectable marker gene for ampicillin resistance (*Amp<sup>r</sup>*).

## Zvýšení produkce proteinu lze docílit i

- Zvýšením počtu kopií klonovaného genu tak, že
- do expresního vektoru je vložen fragment DNA obsahující více kopií tandemově uspořádaného genu
- Každá sekvence musí být ve správné orientaci pro transkripci a translaci.

## Obr.4.11

- Zvýšení produkce proteinu zvýšením počtu kopií genů v plasmidech

## Exprese cizorodých proteinů v jiných mikroorganismech než *E. coli*

- *E. coli* není nezbytně nutné používat pro expresi cizorodých proteinů
- Jiné mikroorganismy nejsou dostatečně prozkoumány (fyziologie, genetika, molekulární biologie)
- Strategie vypracované pro *E. coli* se dají použít i u jiných mikroorganismů

## Testování expresních vektorů s různými promotory v různých bakteriálních druzích

- Pod různé promotory byl včleněn gen kódující beta-galaktosidázu
- A byla testována hladina exprese tohoto genu (aktivita syntetizovaného enzymu)



# Exprese cizorodých proteinů v jiných mikroorganismech než *E.coli* (Glick 2003)

Table 6.2  $\beta$ -Galactosidase activity expressed by gram-negative bacteria carrying a plasmid vector with the *E. coli lacZ* gene and a heterologous promoter

| Promoter   | $\beta$ -Galactosidase activity (U) in: |                           |                                |                           |
|------------|---|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|
|            | <i>Escherichia coli</i>                 | <i>Rhizobium meliloti</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | <i>Pseudomonas putida</i> |
| None       | 16                                      | 110                       | 130                            | 150                       |
| Nm         | 1,400                                   | 21,800                    | 13,900                         | 16,300                    |
| <i>lac</i> | 2,000                                   | 9,050                     | 6,250                          | 9,800                     |
| <i>tac</i> | 11,300                                  | 2,850                     | 1,150                          | 2,950                     |
| S1         | 40                                      | 3,300                     | 1,200                          | 3,350                     |

Adapted from Labes et al., *Gene* 89:37–46, 1990.

# Ukázalo se, že

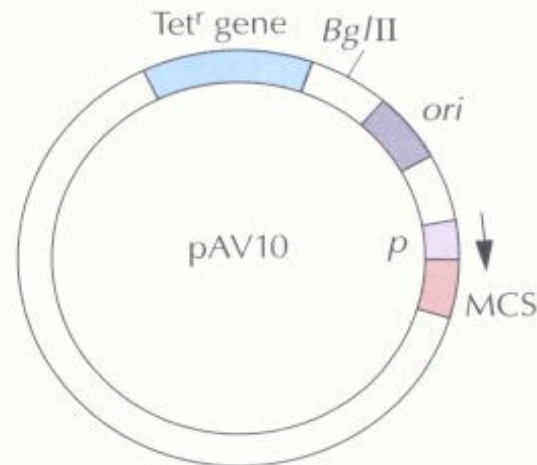
- Všechny promotory byly aktivní u všech testovaných bakterií, i když v různém rozsahu
- tac promotor byl nejaktivnější v *E. coli*
- Promotor genu pro neomycin rezistenci byl nejméně aktivní v *E. coli* a nejvíce aktivní u jiných bakteriálních druhů
- Nejlepším promotorem v určitém organismu nemusí být promotor nejúčinnější v *E. coli*

## Jako univerzální vektor pro Gramnegativní bakterie

- Byl zkonstruován plasmid pAV10
- Do mnohočetného klonovacího místa plasmidu pRK290 s širokým spektrem hostitelů byl včleněn 70 bp fragment transpozonu Tn5, který obsahuje 2 překrývající se promotory
- Tn5 je aktivní v různých bakteriálních druzích a jeho promotory mohou usnadnit transkripci cizorodého genu

# Univerzální expresní vektor pro Gramnegativní bakterie (Glick 2003)

*Figure 6.6* Cloning vector pAV10. The arrangement of the tetracycline resistance gene ( $Tet^r$ ), a *Bgl*III restriction endonuclease site, the origin of replication (*ori*), a promoter (*p*), and a multiple cloning sequence (MCS) is shown. Insertion of a cloned gene into the multiple cloning sequence puts it under the control of the inserted Tn5 promoter (*p*). The arrow shows the direction of transcription. The plasmid is not drawn to scale.



## V plasmidu pAV10

- Byl klonován gen pro beta-galaktosidázu
- Účinná exprese byla zjištěna u různých druhů
- *Alcaligenes sp.*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*
- Promotory Tn5 lze použít k transkripci cizorodých genů v různých bakteriálních hostitelích

## Alternativní přístup využívá syntetických promotorů

- Jedná se zejména o promotory BMK (*Lactococcus a j.*, které jsou používány při výrobě sýrů nebo jogurtů)
- Genetické manipulace mají zvýšit kvalitu výrobku a nesmí negativně ovlivnit žádnou vlastnost
- Genovou expresi nelze řídit přidáním chemického induktoru nebo změnou teploty
- Genová exprese s využitím konstitutivních promotorů BMK byla nedostatečná
- Silný promotor byl syntetický promotor

## Byla zkonstruována

- Plasmidová knihovna syntetických promotorů *Lactococcus lactis*
- Oblasti -10 a -35 zůstaly zachovány, avšak sekvence mezi nimi byly změněny
- Obr.

## Změněné sekvence syntetických promotorů (Glick 2003)

5'-CATNNNNAGTTTATTCTTGACANNNNNNNNNNNNNTGRTATAATANNWNAGTACTGTT  
-35 -10

*Figure 6.7* Consensus oligonucleotide sequence of *Lactococcus lactis* constitutive promoters. The -10 and -35 regions are shown in red, and the spacer region is shown in blue. To generate the library of synthetic promoters, the N sites were composed of 25% each A, C, G, and T; R was 50% A and 50% G; and W was 50% A and 50% T.



## Změna sekvencí ovlivnila sílu promotorů

- Z 36 různě konstruovaných promotorů byl nejaktivnější promotor 400x silnější než nejslabší promotor.
- Z nich lze vybírat nejvhodnější promotory pro expresi klonovaných genů u *Lactococcus lactis*