



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов



Совершенствование методов редактирования генома *Escherichia coli* с использованием системы гомологичной рекомбинации λ Red

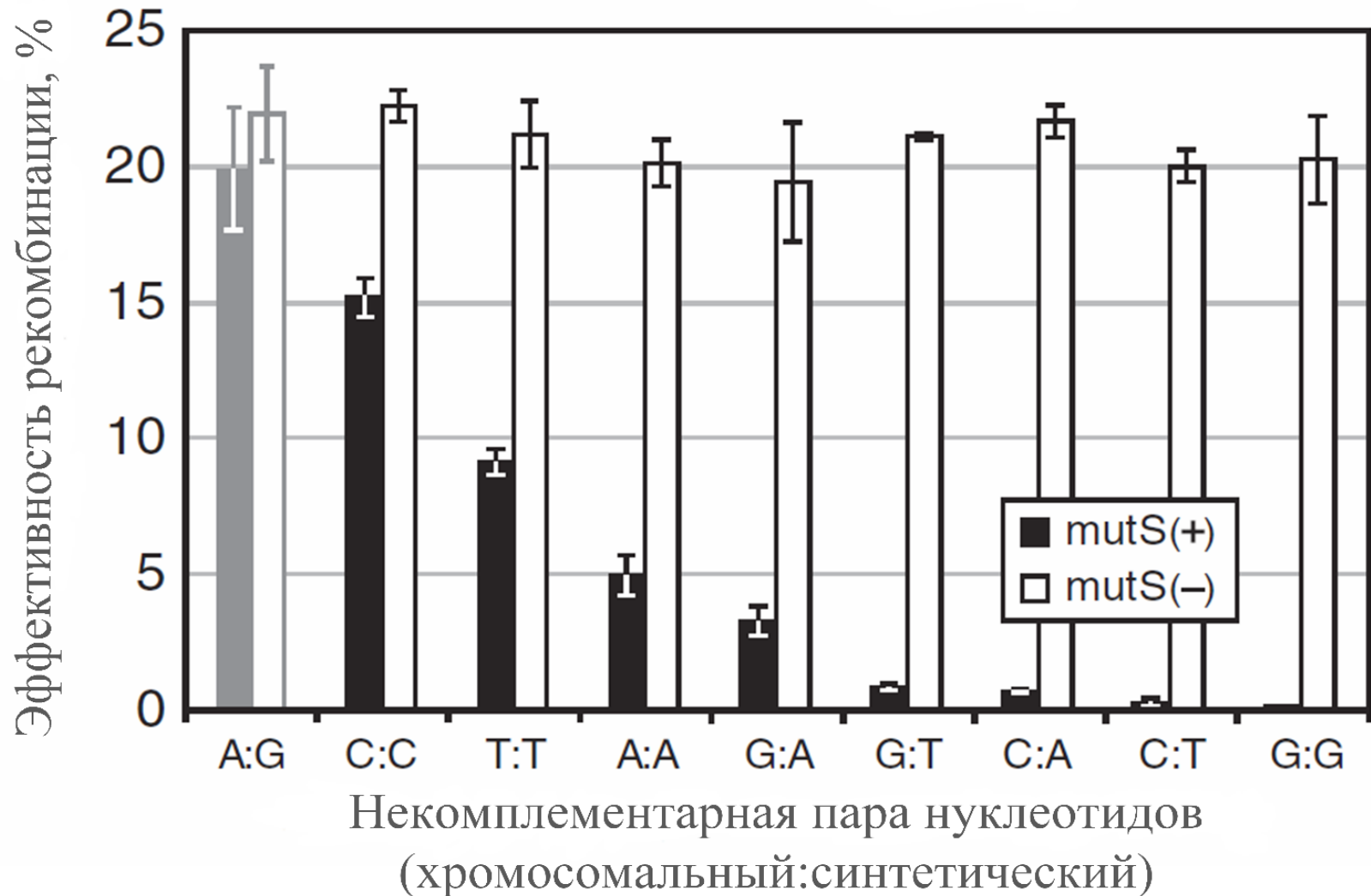
Бубнов Дмитрий Михайлович
Национальный биоресурсный центр –
«Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов»

Москва, 2018

Вспомогательные конструкции, предназначенные для экспрессии λ Red в клетках *E. coli*

Вспомогательная конструкция	Ориджин репликации	Контроль экспрессии λ Red	Источник
Профаг λ $\Delta[cro-bioA]$ (серия штаммов HME)	—	P_L/CI^{857} (TS)	(Yu et al., 2000)
pSIM5	pSC101 (TS)	P_L/CI^{857} (TS)	(Datta et al., 2006)
pSIM9	RK2 (TS)	P_L/CI^{857} (TS)	(Datta et al., 2006)
pKD46	pSC101 (TS)	$P_{araBAD}/araC$	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKM208	pSC101 (TS)	$P_{tac}/LacI$	(Murphy, 1998)
pRed/ET	pSC101 (TS)	$P_{araBAD}/araC$	(Wang et al., 2006)

Эффективность рекомбинации олигонуклеотидов зависит от типа замены



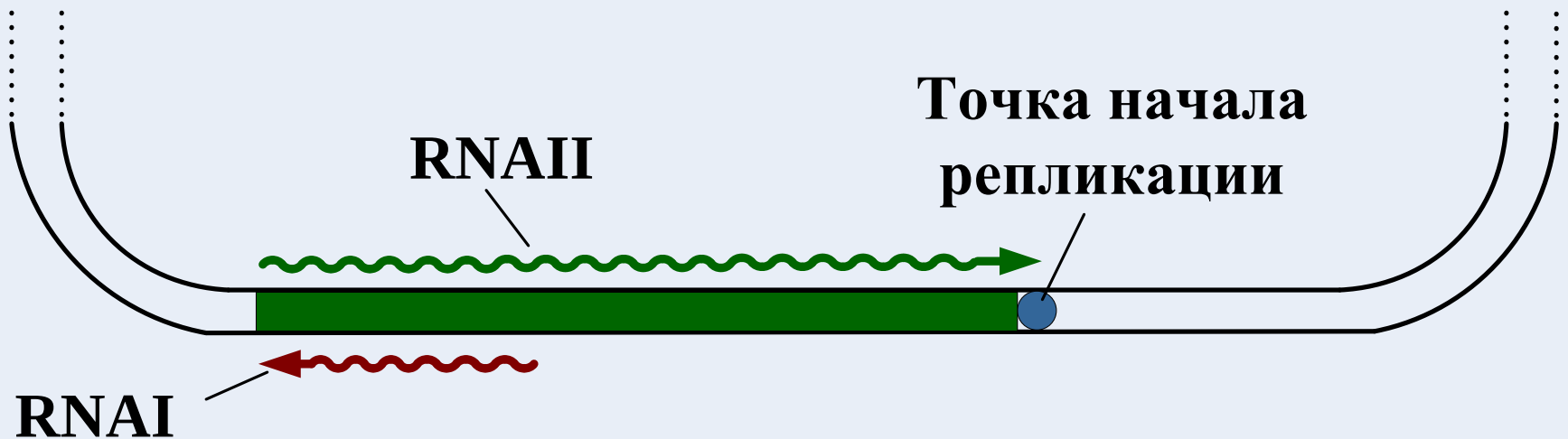
По Wang et al., 2011, с
изменениями

Ключевые недостатки

1. Температурный контроль репликации
2. Температурный контроль экспрессии генов системы λ Red
3. Зависимость эффективности рекомбинации олигонуклеотидов от активности системы репарации MutHLS

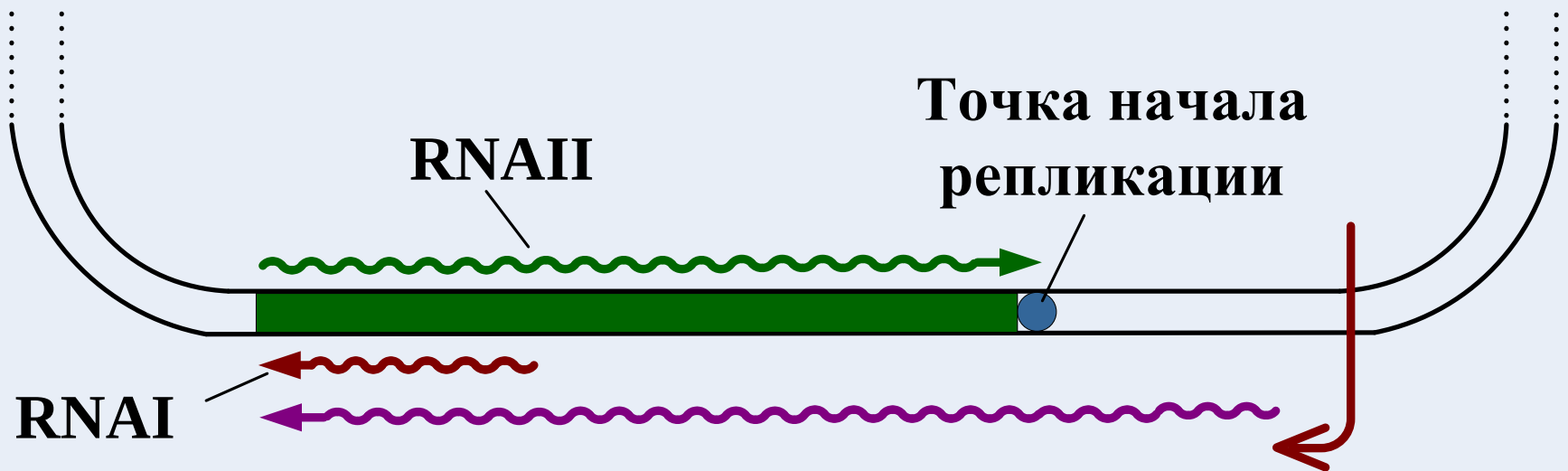
Конструирование вектора, содержащего регулируемый ориджин репликации

Ориджин pBR322

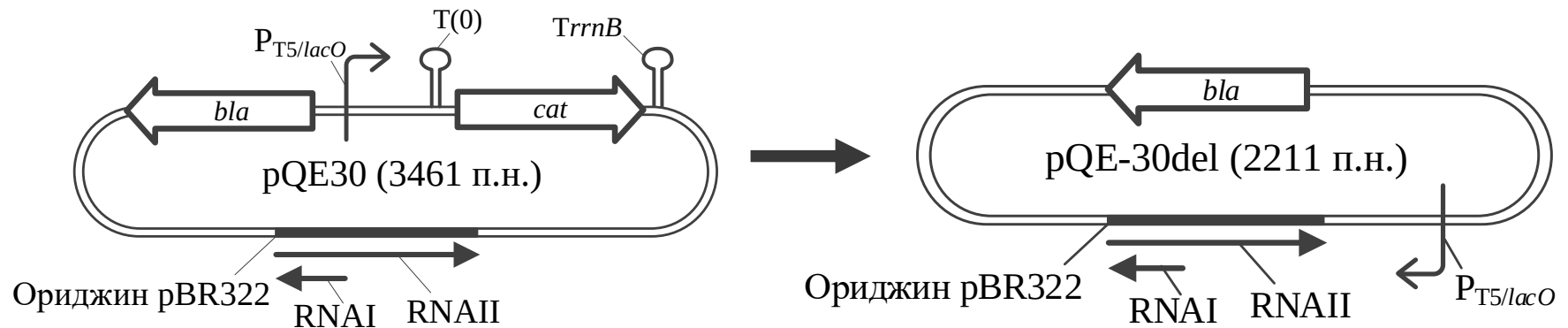


Конструирование вектора, содержащего регулируемый ориджин репликации

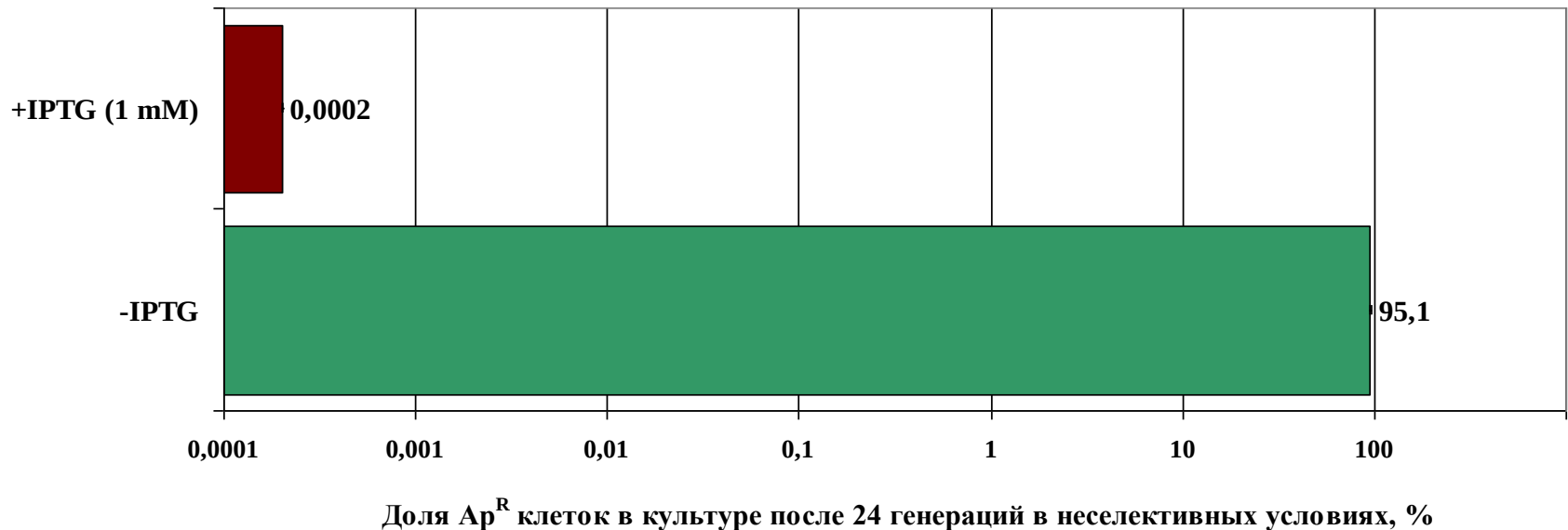
Ориджин pBR322



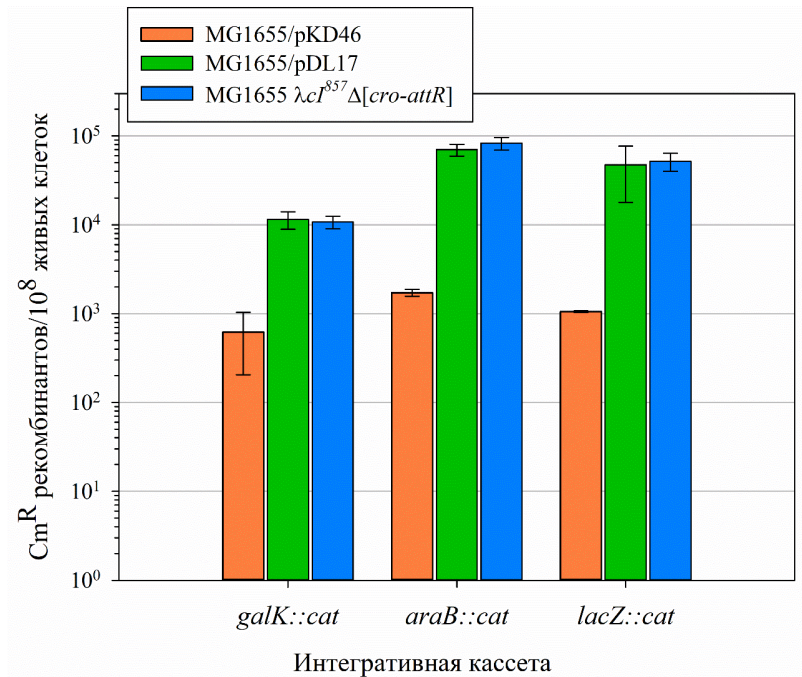
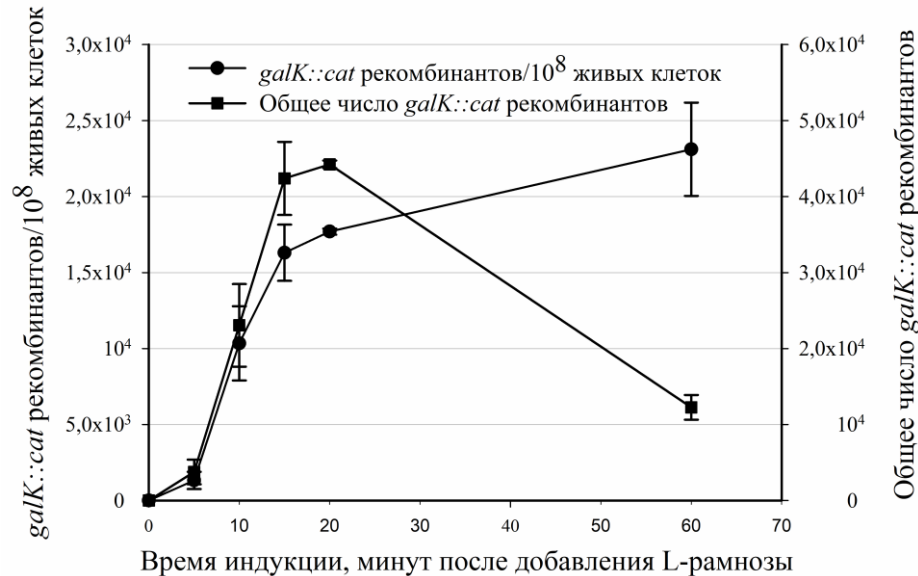
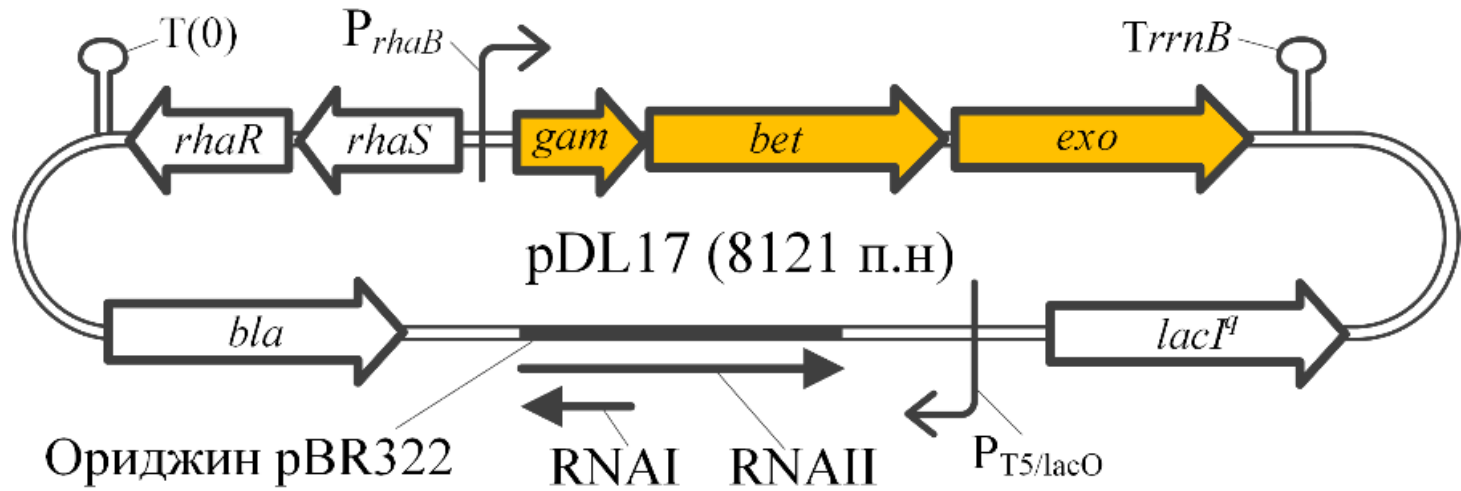
Конструирование вектора, содержащего регулируемый ориджин репликации



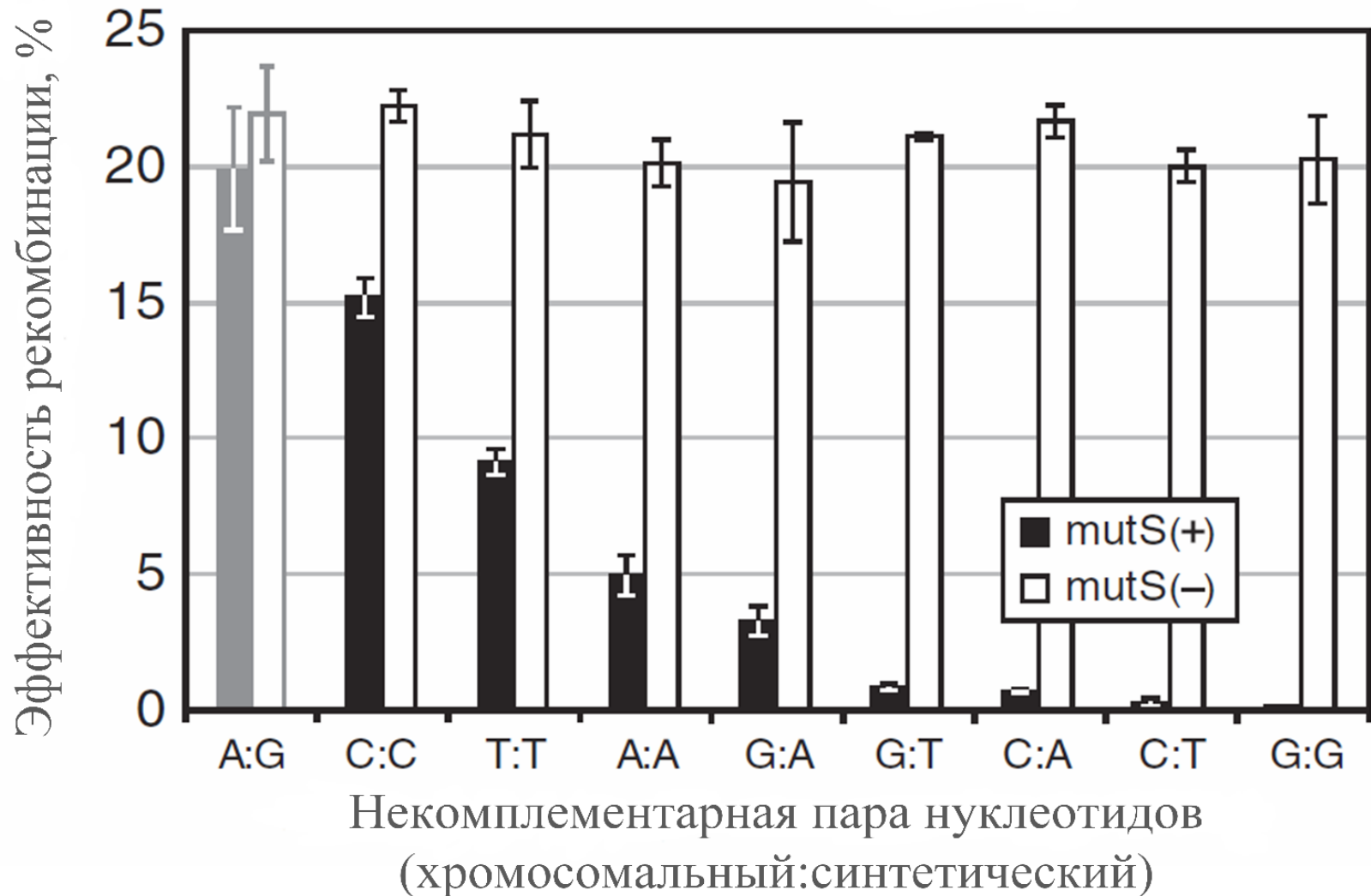
Стабильность pQE30del на фоне хромосомной копии аллеля *lacI^q* в штамме XL1 BLue



Эффективность рекомбинации двунитевых интегративных кассет

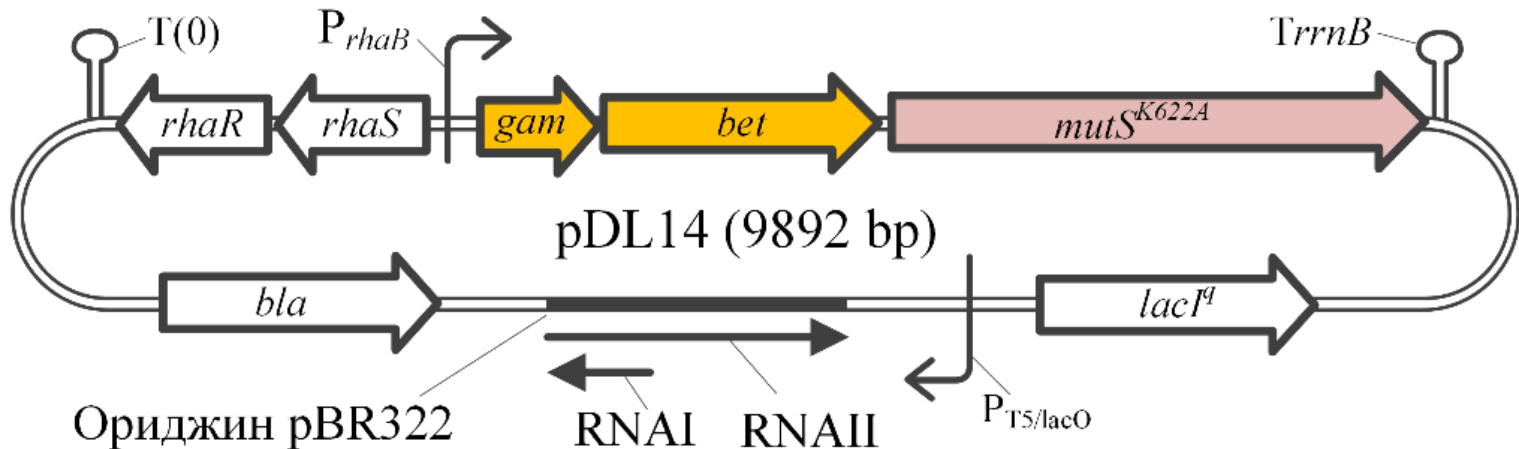


Эффективность рекомбинации олигонуклеотидов зависит от типа замены



По Wang et al., 2011, с
изменениями

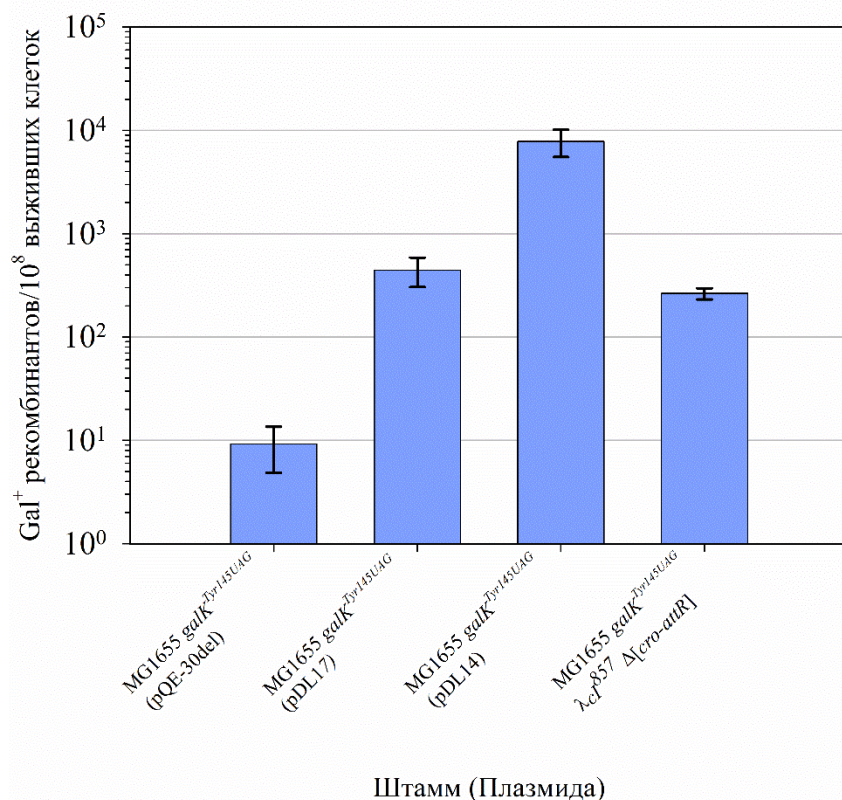
Доминантный негативный аллель *mutS*^{K622A} подавляет активность комплекса MutHLS



Плазмида	Генотип штамма хромосома (плазмида)	Вносимая мутация			
		<i>galK</i> <i>UAG145UAU</i>	<i>lacZ</i> <i>UAC96UAG</i>	<i>araB</i> <i>UAC57UAG</i>	<i>manX</i> <i>UAC161UAG</i>
		Тип некомплементарной пары оснований			
		C:T	G:G	G:G	G:G
		Эффективность рекомбинации (доля рекомбинантов), %			
pDL14	MG1655 <i>galK</i> ^{Tyr145UAG} <i>mutS</i> ^{wt} (<i>gam bet mutS</i> ^{K622A})	13,6 ± 3,3	10,2 ± 1,1	11,8 ± 2,5	18,1 ± 6,2
pDL17	MG1655 <i>galK</i> ^{Tyr145UAG} <i>ΔmutS</i> (<i>gam bet exo</i>)	20,1 ± 1,7	12 ,3 ± 2,1	16,2 ± 3,4	22,7 ± 4,7
pDL17	MG1655 <i>galK</i> ^{Tyr145UAG} <i>mutS</i> ^{wt} (<i>gam bet exo</i>)	0,24 ± 0,05	<0,5	<0,5	<0,5

Уровень базальной экспрессии λ Red и $mutS^{K622A}$ на pDL17 и pDL14 без индукции L-рамнозой

Эффективность рекомбинации без индукции



Скорость накопления спонтанных мутаций

