

MARIAN SĘKTAS

Katedra Mikrobiologii

Uniwersytet Gdański

Kładki 24, 80-822 Gdańsk

e-mail: sektas@biotech.univ.gda.pl

EKSPRESJA GENÓW KLONOWANYCH W WEKTORACH PLAZMIDOWYCH W ZREKOMBINOWANYCH SZCZEPACH *ESCHERICHIA COLI*

SYSTEMY EKSPRESJI GENÓW

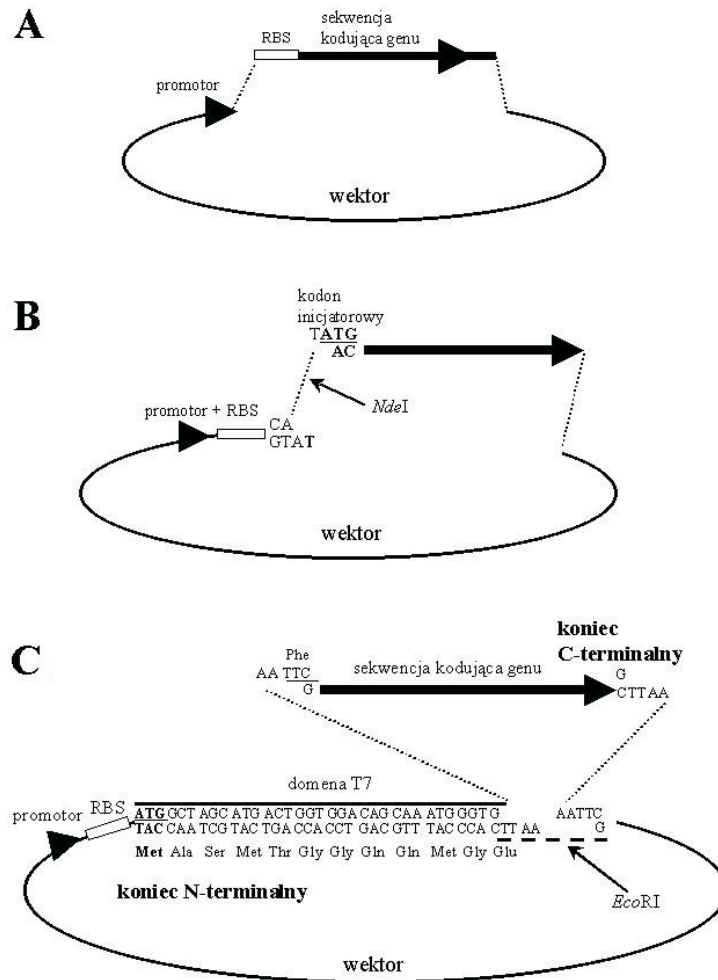
Praktyczne wykorzystanie wiedzy o strukturze i regulacji replikacji plazmidów bakteryjnych oraz budowie i funkcji promotorów, gdzie inicjowany jest proces transkrypcji DNA, pozwoliło na konstrukcję technikami rekombinacji DNA *in vitro*, specjalnej klasy plazmidów nazywanych wektorami ekspresyjnymi. Plazmid jako autonomicznie replikujący się nośnik klonowanego genu daje możliwość podniesienia ilości kopii danego genu (dawki genu) oraz regulacji jego ekspresji, a ponadto ułatwia jego modyfikacje genetyczne. W efekcie otrzymujemy nadprodukcję białka stanowiącą kilka- do kilkudziesięciu procent wszystkich białek komórkowych. Zazwyczaj wektory ekspresyjne wykorzystuje się do nadprodukcji białek w odpowiednio dobranym pod względem cech genetycznych szczepie gospodarza. Zapewnia on właściwą kontrolę ekspresji genu. Wektor funkcjonujący w specyficznym gospodarzu stanowi łącznie system ekspresyjny. Powszechne wykorzystywanie systemów ekspresyjnych przyczyniło się do znacznego podniesienia poziomu produkcji białek i wydajności technik związanych z ich izolowaniem i oczyszczaniem (MAKRIDES 1996). Konsekwencją tego jest istotne przyspieszenie badań nad rolą i właściwościami białek. Budowa wektorów oparta jest na różnego typu naturalnych replikonach wraz z genami markerów ułatwiającymi selekcję właściwych klonów. Plazmidowy wektor stanowi strukturalną i

funkcjonalną całość, chociaż utworzony jest z fragmentów DNA pochodzących z różnorodnych naturalnych źródeł, najczęściej plazmidowego, wirusowego lub chromosomowego DNA. Zasadniczym elementem struktury wektora ekspresyjnego jest efektywny i dobrze regulowany promotor, pozwalający na bardzo wydajną transkrypcję, oraz rejon do klonowania genów złożony z rzadkich miejsc restrykcyjnych (ang. multiple cloning site, MCS). Umiejętność stosowania plazmidowych wektorów daje szereg korzyści m.in.: (i) ułatwienie manipulowania i klonowania DNA, (ii) możliwość usytuowania danego fragmentu DNA w dowolnym otoczeniu genetycznym, (iii) utrzymywanie minimalnego poziomu ekspresji badanego genu w stanie represji systemu, (iv) szybką i prostą metodę indukcji ekspresji genu. Pomimo faktu, że nie każdy gen może ulegać wydajnej ekspresji w szczepach *Escherichia coli*, organizm ten jest nadal niezwykle użyteczny w przedsięwzięciach biotechnologicznych ze względu na stosunkowo niewielkie wymagania pokarmowe oraz niski koszt hodowli (patrz str. 533 w PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION 2000). Najprostszy system ekspresyjny składa się z dwóch zasadniczych elementów: (1) wektora plazmidowego, zawierającego kontrolowany promotor i marker selekcyjny, oraz (2) gospodarza bakteryjnego posiadającego fenotyp dostosowany do właściwego funkcjonowania wektora.

OPTIMALIZACJA SEKWENCJI KLONOWANYCH GENÓW

Od wielu lat technologia nadprodukcji białek obejmuje także proces optymalizacji sekwencji kodujących je genów, z uwzględnieniem rejonów promotorowego i terminatorowego transkrypcji. Wektory pozwalają na swobodną genetyczną manipulację genem (np. miejscowo-specyficzną mutagenezę) i jego wszechstronną analizę. Dzięki zastosowaniu metody amplifikacji DNA w reakcji łańcuchowej termostabilnej polimerazy DNA *in vitro* (ang. polymerase chain reaction, PCR) (SAIKI i współaut. 1988), istnieje możliwość wprowadzania pożądaných miejsc restrykcyjnych do początku i końca sekwencji kodującej genu. Pozwala to w następnym etapie na ściśle określoną insercję genu w odpowiednio przygotowany wektor. Rozróżnia się dwa zasadnicze typy wektorów ekspresyjnych. Pierwszy z nich posiada silny promotor, drugi – promotor wraz z kodowanymi sygnałami do translacji – sekwencję RBS (rejon mRNA oddziaływujący z rybosomem podczas inicjacji translacji). Dany typ wektora wykorzystywany jest w zależności od tego, czy docelowy gen posiada silnie czy słabo rozpoznawane w komórkach *E. coli* sygnały inicjacji translacji. Jeżeli klonowany gen nie posiada efektywnego promotora ale zawiera własny rejon RBS to włączany jest do wektora tuż za silnym promotorem. Jest to fuzja genowa transkrypcyjna (Rys. 1A). Odległość promotora od sekwencji kodującej genu nie ma tu istotnego wpływu na wydajność transkrypcji. Kiedy zdecydujemy się na wykorzystanie sygnałów translacyjnych obecnych w wektorze konieczna jest modyfikacja sekwencji genu w miejscu kodonu inicjatorowego translacji (ATG). Wprowadzając nowy układ nukleotydów tworzący miejsca restrykcyjne *Nde*I (CATATG) lub *Nco*I (CCATGG) obejmujące kodon inicjatorowy (podkreślony), umożliwiamy precyzyjną insercję genu w ramkę odczytu obecnego w wektorze rejonu RBS, złożonego z charakterystycznych sekwencji: Shine-Dalgarno (SD) i kodonu ATG. W tego rodzaju fuzji genowej translacyjnej wektor dostarcza genowi docelowemu zarówno promotora jak i silnej sekwencji SD (Rys. 1B). Powstaje wtedy również białko niezmienione, dzikiego typu. W obu wyżej wymienionych przypadkach fuzji transkrypcja genu znajduje się pod kontrolą promotora z wektora. Zastępowanie naturalnych rejonów RBS efektywnymi odpowiednikami

wirusowymi ma jeszcze dodatkowy cel. Ze względu na znaczne tempo transkrypcji prowadzonej np. przez polimerazę RNA T7, transkrypty genów posiadających „słabe” rejon RBS ulegają często enzymatycznej degradacji, co prowadzi do drastycznego obniżenia poziomu ekspresji (IOST i współaut. 1992). Dzieje się tak na skutek znacznie wolniejszego tempa inicjacji translacji w porównaniu do inicjacji transkrypcji, przez co rejon transkryptu nie pokryty rybosomami jest narażony na działanie endorybonukleaz. Asynchronizacja transkrypcji i translacji, procesów które u Prokaryota zachodzą niemal równocześnie, wpływa negatywnie na ogólną wydajność ekspresji genu. Potwierdzeniem tej prawidłowości jest obserwacja, że mutacja chromosomowa w genie *rne*, kodującym główną endorybonukleazę komórkową RNazę E, znacznie obniża stopień degradacji takich transkryptów (IOST i DREYFUS 1995). Obecnie wektory ekspresyjne zawierają rejon MCS całkowicie zaprojektowane i zsyntetyzowane. Wprowadza się tam m.in. determinanty genetyczne kodujące specyficzne układy aminokwasów (domeny białkowe, ang. tag). Umożliwia to przeprowadzanie fuzji genu docelowego z odpowiednio wybraną domeną. Fuzje genowe znajdują szerokie zastosowanie głównie w ułatwianiu identyfikacji hybrydy przy pomocy przeciwciał skierowanych przeciwko określonej domenie. Ponadto, obecność domen peptydowych wykorzystuje się do upraszczania procedur oczyszczania produktów białkowych, jak np. w przypadku hybryd białkowych z peptydem złożonym z sześciu reszt histydynowych (His-tag) czy też z komponentą rybonukleazy S (S-tag). Takie białka hybrydowe można specyficznie wiązać na specjalnych złożach chromatograficznych dzięki obecności wyżej wspomnianych domen peptydowych. Wykorzystywanie domen peptydowych posiadających aktywność katalityczną pozwala na ilościowy pomiar takiego produktu, zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo*. Proces łączenia dwóch genów wymaga znacznie większej precyzji w zaplanowaniu obu końców DNA w miejscu ich połączenia. Wybór odpowiedniego miejsca restrykcyjnego jest podyktowany zachowaniem specyficznej dla danego genu translacyjnej ramki odczytu (Rys. 1C i 2). Fuzji translacyjnych dokonuje się zwykle z fragmentami DNA ko-



Rys. 1. Fuzje genowe. (A) transkrypcyjna; (B) translacyjna; (C) translacyjna złożona, dająca białko hybrydowe.

NdeI, *EcoRI* – oznaczają nazwy enzymów restrykcyjnych użytych do trawienia DNA. Met itd. oznaczają skróty nazw poszczególnych aminokwasów.

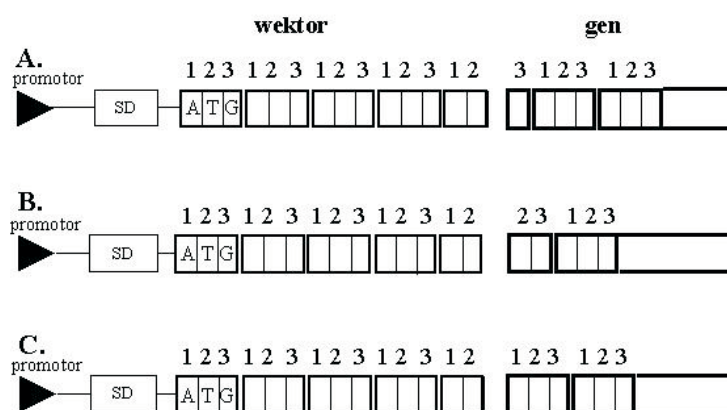
dującymi domeny peptydowe znajdującymi się w tej samej ramce odczytu co kodon ATG wektora (fuzje proksymalne). Powstaje wtedy białko hybrydowe, z dodatkowymi aminokwasami w części N-terminalnej. Przeprowadzane są także fuzje z dystalną częścią docelowego genu, wymagające takiego zaplanowania końca genu, aby zachować właściwą ramkę odczytu dla fragmentu DNA kodującego C-końcowy peptyd (fuzja dystalna). Prezentowane przykłady pokazują, że dzięki technikom inżynierii genu możliwa jest taka korekta jego budowy, która zapewnia większą wydajność eks-

presji genu. Natomiast poprzez wybór właściwego gospodarza bakteryjnego możemy wpływać na kontrolę poszczególnych etapów procesu ekspresji genu. Przykładami takich bakterii są rekombinanty zawierające w chromosomie dodatkowe kopie genów kodujących białka kontrolujące proces transkrypcji (np. represory) oraz zastosowanie defektywnych mutantów do wydłużania stabilności transkryptów mRNA (*rne*), lub wydłużania stabilności powstających produktów białkowych (*ompT* i *lon*, kodujących proteazy OmpT i La).

SYSTEM NADPRODUKCJI BIAŁEK BAKTERIOFAGA T7

Jednoznaczna odpowiedź na pytanie, który z obecnie dostępnych systemów ekspresyj-

nych zapewnia najwyższy poziom nadprodukcji białka w każdym indywidualnym przypadku



Rys. 2. Przykłady fuzji genowych translacyjnych prawidłowej (A) i nieprawidłowych z przesunięciem ramki odczytu (B i C).

Zaznaczono położenie promotora, sekwencji SD i kodonu inicjatorowego. Pozycje nukleotydów tworzących naturalnie uszeregowane kodony ponumerowano odpowiednio 1, 2 i 3.

nie jest możliwa. Wybór odpowiedniego systemu będzie zależał od wielu czynników, a w szczególności od stopnia tolerancji komórek gospodarza na obecność obcego białka oraz z zasady, że siła promotora determinuje możliwy do osiągnięcia stan jego represji (LANZER i BUJARD 1988). W zależności od tego wybieremy system, w którym słabszy promotor jest ściślej kontrolowany albo silny promotor jest gorzej regulowany. Tego dokonuje się już na etapie wyboru odpowiedniego wektora, charakteryzującego się określoną liczbą kopii na komórkę bakteryjną. Przykładowo wektor, którego struktura oparta jest na rejonie replikacyjnym plazmidu koniugacyjnego F osiąga poziom 1–2 kopii plazmidu na komórkę bakteryjną; pochodne plazmidu pSC101 replikują się na poziomie 5–8 kopii na komórkę; pochodne replikonu P15A utrzymują stan 15–20 kopii na komórkę; pochodne plazmidu pBR322 – 30–40 kopii a pochodne plazmidu pUC replikują się na poziomie ponad 600 kopii na komórkę (HELINSKI i współaut. 1996). Najczęściej wykorzystywanymi promotorami w konstrukcjach wektorowych są promotory bakteriofagowe (P_L i P_R z faga λ oraz $\phi 10$ z faga T7 – oba swoiste dla *E. coli*; MAKRIDES 1996) jak i pochodzące od wirusów eukariotycznych, w przypadku wektorów do pracy w komórkach eukariotycznych (np. P_{CMV} z wirusa cytomegalii w plazmidowej pochodnej wirusa SV40). Niektóre promotory pochodzące z chromosomu *E. coli* są również wykorzystywane. Za

przykład mogą służyć promotor laktozowy P_{lac} i jego pochodne $P_{lacUV5L8}$, P_{tac} , oraz promotor arabinozowy P_{BAD} . Analizując właściwości dostępnych systemów ekspresyjnych pod kątem stopnia regulacji ekspresji, osiąganego poziomu nadprodukcji białka, powszechności użycia, a także różnorodności dodatkowych zastosowań, nasz wybór padnie na system wywodzący się z genomu bakteriofaga T7, skonstruowany w połowie lat 80., niezależnie w dwóch laboratoriach amerykańskich (TABOR i RICHARDSON 1985, STUDIER i MOFFAT 1986). System jest złożony w swojej podstawowej formie z genu, kodującego polimerazę RNA faga T7, oraz z promotora T7 ($\phi 10$), wywodzącego się również z genomu tego bakteriofaga. System T7 posiada wiele unikatowych właściwości. Specyficzny promotor rozpoznawany jest przez polimerazę RNA faga T7 a nierozpoznawany przez polimerazę komórkową gospodarza. Polimeraza faga ma zdolność do 8-krotnie szybszego wydłużania transkryptów w porównaniu z polimerazą gospodarza (IOST i współaut. 1992). Polimeraza RNA T7 jest niewrażliwa na antybiotyk rifampicynę co jest wykorzystywane do blokowania ekspresji genów gospodarza, w celu specyficznego wyznakowania i identyfikacji białek kodowanych przez geny, których ekspresja zależna jest od promotora T7. Polimeraza fagowa jest wrażliwa zasadniczo tylko na swoiste terminatory transkrypcji i usytuowanie takiego terminatora w wektorze przyczynia się do podniesienia wydajności

procesu transkrypcji. Specyficzna terminacja przyspiesza cyrkulację enzymu czyli gotowość pojedynczej molekuly enzymu do kolejnych rund inicjacji transkrypcji genu docelowego. W zależności od stopnia złożoności wektora rejon transkrypcji może zawierać albo tylko sekwencję promotora T7, która stanowi konserwatywny układ 23 nukleotydów, albo dodatkowo rejon RBS, pochodzący z genu białka otoczki 10. RBS obejmuje 6-cio nukleotydową sekwencję SD, sekwencję *epsilon* oraz kodon inicjatorowy ATG (OLINS i współaut. 1988, OLINS i RANGWALA 1989, ROSENBERG i współaut. 1987; STUDIER i współaut. 1990). W niektórych konstruktach w rejonie promotorowym T7 wprowadzono ponadto sekwencję operatora *lacO* wiążącą represor laktozowy LacI (DUBENDORFF i STUDIER 1991). Operator zlokalizowany jest na plazmidach ekspresyjnych tuż za promotorem, a przed sekwencją *epsilon*. Obecność represora LacI zabezpiecza przed przypadkową transkrypcją powodowaną aktywnością innych promotorów zlokalizowanych na plazmidzie jak i obecnością polimerazy RNA T7 w niskim stężeniu w komórce. Istnieją trzy zasadnicze sposoby dostarczania genu polimerazy RNA faga T7 do systemu ekspresyjnego i indukcji jego ekspresji. Jednym ze sposobów jest metoda infekcji bakterii niosących wektor z klonowanym genem zmodyfikowanym wirusem λ , M13 lub T7 (STUDIER i MOFFATT 1986). ródłem genu może być średniokopiowy plazmid, w którym gen kodujący polimerazę znajduje się pod kontrolą temperaturowrażliwego represora faga λ -CI857. Daje to możliwość termicznej indukcji transkrypcji

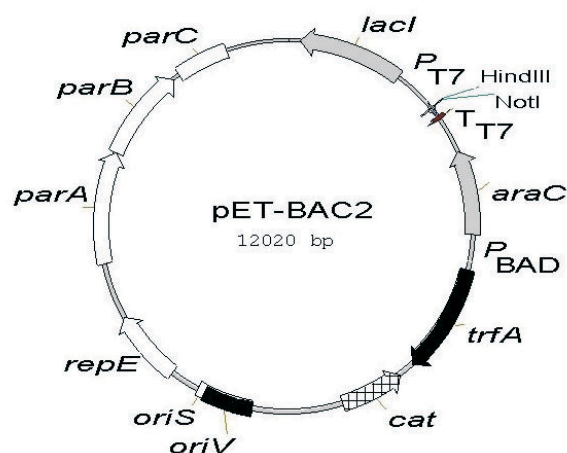
tego genu (TABOR i RICHARDSON 1985). Zdecydowanie najlepszą metodą jest zastosowanie zrekombinowanego szczepu *E. coli* z genem polimerazy zlokalizowanym na defektywnym profagu λ , trwale zintegrowanym z chromosomem gospodarza w miejscu *attB*. Gen ten znajduje się pod kontrolą represora LacI i promotora $P_{lacUV5L8}$ (STUDIER i MOFFATT 1986). W tym przypadku indukcja ekspresji polega na podaniu induktora IPTG (izopropyl- β -D-tiogalaktozyd) w celu inaktywacji represora laktozowego, co prowadzi zarówno do aktywacji promotora laktozowego P_{lacUV5} (ekspresja polimerazy RNA T7), jak i odblokowania pełnych możliwości transkrypcyjnych rejonu promotorowego T7 z operatorem *lacO*. Rezultatem indukcji systemu zawierającego gen polimerazy RNA T7 oraz gen docelowy zależny od promotora $\phi 10$ jest uzyskanie nadprodukcji białka stanowiące kilka- do kilkudziesięciu procent wszystkich białek komórkowych. Ostatnio system T7 został uzupełniony o plazmid zawierający geny kodujące tRNA rozpoznające rzadko występujące kodony na mRNA, niecharakterystyczne dla *E. coli* (NOVY i współaut. 2001). Umożliwia to produkcję białek kodowanych przez geny pochodzące od niespokrewnionych z tą bakterią organizmów. Podobnie modyfikacjom i udoskonaleniom stale ulega szczep gospodarza *E. coli* niosący gen polimerazy RNA T7. Uzyskanie mutantu z delecją operonu laktozowego (m. in. brak permeazy laktozowej) umożliwia liniową i bezpośrednią zależność pomiędzy stężeniem stosowanego induktora IPTG a jego efektywnym poziomem we wnętrzu komórki bakteryjnej.

ŚCISŁA KONTROLA TRANSKRYPCJI GENU

Poważnym problemem w procesie nadprodukcji białek jest brak ścisłej kontroli ekspresji genu polimerazy RNA T7 („przeciekanie transkrypcji”, ang. leakage), co powoduje niekontrolowaną ekspresję genu docelowego. Stały, niski poziom ekspresji genu polimerazy prowadzi w niektórych przypadkach do niestabilnego utrzymywania się plazmidu ekspresyjnego w komórkach (STUDIER i współaut. 1990, MERTENS i współaut. 1995, GROSSMAN i współaut. 1998) lub do ich śmierci (DONG i współaut. 1995). Dotyczy to szczególnie genów kodujących białka o silnej aktywności biologicznej. Taki stan permanentnej ekspresji może prowadzić również do selekcji klonów „nieproduk-

tywnych”, w których DNA plazmidu ekspresyjnego uległo niekorzystnym przekształceniom. Łagodnym skutkiem tego zjawiska jest produkcja białka na bardzo niskim poziomie lub jej całkowity brak (DOHERTY i współaut. 1993). Istnieje szereg narzędzi molekularnych do uściślenia kontroli ekspresji genu polimerazy RNA T7. Naturalnym inhibitorem aktywności polimerazy RNA jest lizozym T7. Wprowadzenie genu tego białka na dodatkowym plazmidzie i zapewnienie jego konstytutywnej transkrypcji skutecznie eliminuje aktywność polimerazy w warunkach represji (STUDIER 1991, DUBENDORFF i STUDIER 1991). Powoduje to niestety także efekty uboczne w postaci obniżenia całkowitej wy-

dajności produkcji białka oraz przedwczesną autolizę zaindukowanych bakterii. Innym sposobem na obniżenie poziomu polimerazy RNA faga T7 w fazie represji jest zastosowanie 0.2%–1% dodatku glukozy do pożywki, co wywołuje globalny efekt obniżenia poziomu cAMP i dezaktywację wielu promotorów zależnych od białka aktywatora CAP (GROSSMAN i współaut. 1998). Wykazano, że pomimo obecności mutacji L8, która znacznie obniża stopień wiązania się białka CAP w rejonie promotorowym P_{lacUV5} , indukcja transkrypcji z tego promotora jest nadal zależna od stymulacji CAP/cAMP (PAN i MALCOLM 2000). W tej sytuacji obecność glukozy zapobiega takiej aktywacji. W związku z problemem toksyczności produktów genów rozpoczęto poszukiwania możliwości kontrolowania liczby kopii genu docelowego poprzez regulację liczby kopii wektora ekspresyjnego, od minimalnej liczby kopii w warunkach represyjnych do dużej w miarę potrzeb, np. w czasie ekspresji genu lub na etapach klonowania lub sekwencjonowania genu. Wydaje się, że skonstruowany ostatnio wektor ekspresyjny z modulowaną kontrolą replikacji plazmidu od 1 kopii do ponad 40 kopii, daje najniższy poziom niekontrolowanej ekspresji genu w warunkach represji systemu T7 (SEKTAS i SZYBALSKI 2002). Struktura tego wektora jest oparta na plazmidzie pBeloBAC11 (KIM i współaut. 1996). Wektor nazwany pET-BAC2 (Rys. 3) posiada dwa niezależne replikony: konstytutywny – pochodzący z plazmidu F, złożony z origin replikacji *oriS*/RepE wraz z systemem partycji *parABC*, oraz warunkowy – złożony z origin replikacji *oriV* wywodzący się z plazmidu RK2 wraz z genem kodującym swoiste białko inicjujące replikację – TrfA, kontrolowanym przez promotor arabinozowy P_{BAD} (WILD i współaut. 2001). Dzięki pierwszej funkcji plazmid jest stabilnie utrzymywany w komórce przy stałej ilości kopii 1–2. Hodowla komórek niosących taki plazmid w pożywce z dodatkiem glukozy (0,2%), daje nadzwyczaj wysoki poziom represji promotora T7, i nieomal całkowite wyeliminowanie niekontrolowanej transkrypcji. Wyniki pomiaru ekspresji genu reporterowego *lacZ* w zależności od liczby kopii wektora, w stanie przed jak i po indukcji, ilustruje Tabela 1. Poziom kontroli genu reporterowego badano poprzez ilościowy pomiar aktywności jego produktu, enzymu β -galaktozydazy (MILLER 1992). W przypadku plazmidu pET-BAC2 uzyskano wielokrotnie niższy poziom niekontrolowanej transkrypcji w fazie represji w porównaniu do



Rys. 3. Struktura genetyczna wektora ekspresyjnego pET-BAC2, z niezależnie kontrolowanymi funkcjami ekspresji genów (promotor P_{T7}) i amplifikacji DNA (promotor P_{BAD}).

Nazwy genów i elementów regulatorowych oznaczają: *araC* – gen represora/aktywatora AraC; *cat* – gen oporności na chloramfenikol; *lacI* – gen represora laktozowego LacI; *parA* i *parB* – geny białek odpowiedzialnych za partycję plazmidu; *repE* – gen białka RepE inicjującego replikację z *oriS*; *trfA* – gen białka TrfA inicjującego replikację z *oriV*; T_{T7} – terminator transkrypcji T7. Ponadto zaznaczono unikalne miejsca restrykcyjne *HindIII* i *NotI* w miejscu wprowadzania genu docelowego.

poziomu uzyskiwanego przez zastosowanie typowego wektora opartego na replikonie pBR322 (Tabela 1, wiersz 4 i 12). Ponadto, przy optymalnym stężeniu induktora IPTG osiągnano poziom aktywności β -galaktozydazy porównywalny do wektora pBR322 (Tabela 1, wiersz 10 i 13). Nadprodukcja białka z pojedynczej kopii genu jest możliwa w tym plazmidzie za sprawą dodatkowego modułu replikacyjnego *oriV*/TrfA, który umożliwia podniesienie ilości kopii wektora w czasie transkrypcji z promotora T7. Okazuje się, że terminator T7 nie działa ze 100% wydajnością i polimeraza RNA T7 przechodząc „znak stopu” transkrybuje dodatkowo gen *trfA*, który jest położony w zgodnej orientacji. Białko TrfA inicjuje replikację plazmidu z dodatkowego origin *oriV* i to właśnie pozwala na podniesienie liczby kopii wektora (a tym samym dawki genu) do 5–10. Jakby potwierdzeniem tego jest 2–3 krotnie niższy poziom produkcji białka β -galaktozydazy uzyskany z pochodnej plazmidu F nie posiadającej dodatkowego origin replikacji (pBeloBAClacZ – Tabela 1, wiersz 3). Dodatkowym atutem łagodnego zwiększania się liczby

Tabela 1. Poziom ekspresji genu reporterowego *lacZ* w bakteriach *E. coli* Tuner (DE3) w zależności od liczby kopii wektora ekspresyjnego, po 3 godzinach indukcji induktorem IPTG.

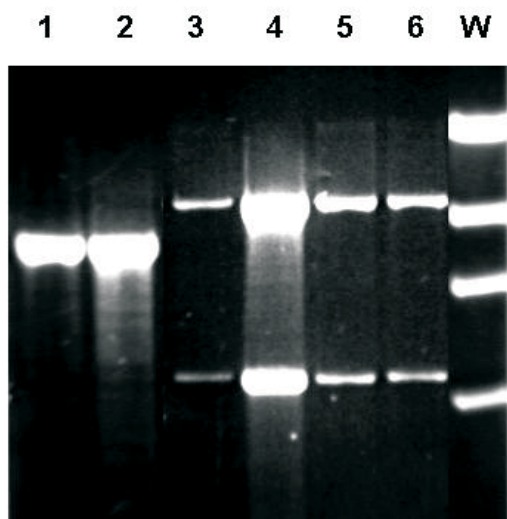
Rodzaj replikonu	IPTG (mM) ^a	Jednostki Millera ^b	Liczba kopii plazmidu ^c
(1) (-)	0,0	1,8	0
(2) F	0,0	21	1–2
(3) F	1,0	17,240	1–2
(4) F/RK2	0,0	18	1–2
(5) F/RK2	0,0 (+0,2% D-glukoza)	9	1–2
(6) F/RK2	0,0 (+0,01% L-arabinoza)	118	20–30
(7) F/RK2	0,05	11,525	3–4
(8) F/RK2	0,1	18,730	4–5
(9) F/RK2	0,2	37,635	4–5
(10) F/RK2	0,5	48,020	3–4
(11) F/RK2	1,0	44,870	2–3
(12) pBR322	0,0	122–800 ^d	30–40
(13) pBR322	1,0	48,370	30–40

^a Bakterie *E. coli* Tuner(DE3) (BL21(DE3) Δ *lac*; SEKTAS i SZYBALSKI 2002) bez plazmidu (wiersz 1) lub nosące następujące plazmidy: pBe-lo-BAClacZ (wiersze 2–3), pET-BAC2lacZ (wiersze 4–11) lub pET24lacZ (linie 12–13) hodowano w 5 ml pożywkach LB w obecności 12,5 μ g chloramfenikolu na ml. Hodowle zainokulowano 1:200 używając nocnej kultury odpowiednich bakterii. Po 1,5 h hodowli w 37°C, zaindukowano ekspresję genu *lacZ* dodając induktora IPTG (od 0,05 do 1,0 mM). Hodowle prowadzono następnie przez 3 godziny. Równolegle hodowano szczepy kontrolne nie poddane indukcji IPTG w pożywce LB (wiersze 1, 2, 4 i 11), lub z dodatkiem D-glukozy (do 0,2% końcowego stężenia; wiersz 4) lub L-arabinozy (do 0,01% końcowego stężenia; wiersz 5). Pomiar aktywności β -galaktozydazy był wykonywany metodą opisaną przez MILLER (1992) wykorzystującą sztuczny substrat ONPG (orto-nitrofenylo- β -galaktopiranozyd). W teście *in vitro* mierzono spektrofotometrycznie stopień enzymatycznego rozkładu ONPG. Do testu pobierano 50 μ l hodowli bakteryjnej. Liczba kopii plazmidów była określana na podstawie densytometrycznego pomiaru liniowej formy plazmidów, po wyizolowaniu z bakterii i rozdzielaniu w żelu agarozowym.

Pierwsza wartość dotyczy serii plazmidów pET- z genem oporności na kanamycynę (np. pET24), druga wartość dotyczy serii plazmidów z genem oporności na ampicylinę (np. pET21).

kopii genu w fazie ekspresji jest brak efektu zahamowania wzrostu hodowli bakteryjnej często obserwowanej w przypadku hodowli z wektorem o wysokiej stałej liczbie kopii. W przypadku plazmidu pET-BAC2 możliwa jest także, niezależna od procesu ekspresji genu, amplifikacja pla-

zmidowego DNA uruchamiana dla potrzeb klonowania lub sekwencjonowania DNA. Po dodaniu induktora arabinozy (0,01%) w ciągu 3–4 godzin uzyskujemy efekt 30–40 krotnej amplifikacji DNA, przy zachowaniu stanu represji promotora T7 (Tabela 1, wiersz 6; Rys. 4, ścieżka 4).



Rys. 4. Porównanie liczby kopii plazmidu pET-24lacZ (pochodna pBR322) oraz pET-BAC2lacZ (pochodna F/RK2) w zależności od rodzaju stosowanego induktora.

Plazmidy izolowano z 3 ml bakterii *E. coli* Tuner(DE3) po 2 godzinnej indukcji oraz nanoszono na 0,65% żel agarozowy z takiej samej ilości bakterii, po uprzednim trawieniu enzymem *Bam*HI. Kolejne ścieżki zawierają następujący DNA plazmidowy: 1 – pET24lacZ z bakterii nieindukowanych; 2 – pET24lacZ z bakterii indukowanych 2mM IPTG; 3 – pET-BAC2lacZ z bakterii nieindukowanych; 4 – pET-BAC2lacZ z bakterii indukowanych 0,01% L-arabinozą; 5 – pET-BAC2lacZ z bakterii indukowanych 0,01% L-arabinozą oraz 2mM IPTG; 6 – pET-BAClacZ z bakterii indukowanych 2mM IPTG; W – wzorce masowe, DNA faga I trawiony *Hind*III. Wielkości prążków w parach zasad od góry żelu: 23.130, 9416, 6557 i 4361.

PODSUMOWANIE

Ekspresja rekombinowanych białek w bakteriach, a w szczególności w szczepach *E. coli* jest wydajnym sposobem na otrzymywanie ogromnych ilości tych białek, które w naturze są produkowane w ilościach śladowych. Wydaje się, że możliwości techniczne i twórcze w tym dziale inżynierii genetycznej, który zajmuje się konstruowaniem wektorów ekspresyj-

nych a także tworzeniem użytecznych rekombinantów bakteryjnych nie zostały do końca wyczerpane. Kierunek poszukiwań w tej dziedzinie był i pozostanie taki sam – zwiększenie efektywności produkcji i uproszczenie procedur oczyszczania białek, znajdowane rozwiązania – zaskakująco różne.

EXPRESSION OF GENES CLONED IN PLASMID VECTORS IN RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

S u m m a r y

Use of *Escherichia coli* bacteria as a host for high-level expression of cloned genes has become common. The purification of a recombinant protein is greatly accelerated if the protein can be isolated from cells that overproduce it. To maximize expression, the cloned gene must be transcribed and translated as efficiently as possible. This is possible due to the construction of expression vectors, modified plasmids with useful features, which can be propagated and controlled in special hosts (expression systems). Usually, vectors for cloning and expressing target DNA are derived from medium-copy plasmids like pBR322. *E. coli* expression systems should meet several criteria including (i) minimal basal expression of the gene to be expressed under repressed conditions, (ii) fast and uncomplicated induction of a wide variety of genes to a high level of expression, and, (iii) easy cloning and DNA manipulation features. This article describes how the most common T7 expression system, derived from bacteriophage T7, functions. The system consists of a plasmid vector that allows cloning of the target DNA under T7 promoter control, and the T7 RNA polymerase gene borne by the recombinant bacterial host. The system is capable of

expressing a wide variety of DNAs from prokaryotic and eukaryotic sources. In principle, the T7 system can be completely selective because host RNA polymerase and phage's polymerase recognize different promoters. However, synthesis of recombinant proteins, especially those that are toxic to the host, must be controlled, being at zero or non-toxic levels in uninduced cells, and high only after induction of expression during the appropriate phase of growth. Basal activity of the T7 RNA polymerase in uninduced cells is lower when the growth medium contains glucose (catabolite repression) and/or its natural inhibitor T7 lysozyme. Another way to reduce the basal expression of the target genes is to use expression vectors with lower or controllable copy numbers. The last possibility is offered by a new single-conditional-medium copy vector, a derivative of two replicons with different functions, *oriS*/RepE from plasmid F and *oriV*/TrfA from RK2 plasmid. The genetic elements from F plasmid enable stable maintenance of a single copy of the plasmid, while the RK2 replicon permits dosage-dependent gene expression and serves as the means for plasmid DNA amplification.

LITERATURA

- DOHERTY J. P., LINDEMAN R., TRENT R. J., GRAHAM M. W., GRAHAM D. M., 1993. *Escherichia coli* host strains SURE and SRB fail to preserve a palindrome cloned in lambda phage; improved alternate host strains. *Gene* 124, 29–34.
- DONG H., NILSON L., KURLAND C. G., 1995. *Gratuitous overexpression of genes in Escherichia coli leads to growth inhibition and ribosome destruction*. *J. Bacteriol.* 177, 1497–1504.
- DUBENDORFF J. W., STUDIER F. W., 1991. *Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor*. *J. Mol. Biol.* 219, 45–59.
- GROSSMAN T. H., KAWASAKI E. S., PUNREDDY S. R., OSBURNE M. S., 1998. *Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability*. *Gene* 209, 95–103.
- HELINSKI D. R., TOUKDARIAN A., NOVICK R. P., 1996. *Replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. NEIDHARDT F. C., CURTISS III R., INGRAHAM J., LIN E. C. C., LOW K. B., MAGASANIK B., REZNIKOFF W. S., RILEY M., SCHAECHTER M., UMBARGER H. (red.). Washington DC, American Society for Microbiology, 2295–2324.
- IOST I., DREYFUS M., 1995. *The stability of Escherichia coli lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation*. *EMBO J.* 195, 3252–3261.
- IOST I., GUILLEREZ J., DREYFUS M., 1992. *Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo*. *J. Bacteriol.* 174, 619–622.
- KIM U.-J., BIRREN B. W., SLEPAK T., MANCINO V., BOYSEN C., KANG H.-L., SIMON M. I., SHIZUYA H., 1996. *Construc-*

- tion and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34, 213–218.
- LANZER M., BUJARD H., 1988. *Promoters largely determine the efficiency of repressor action*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8973–8977.
- MAKRIDES S. C., 1996. *Strategies for achieving high level expression of genes in Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512–538.
- MERTENS N., REMAUT E., FIERIS W., 1995. *Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids*. *Biotechnology* 13, 175–179.
- MILLER J. H., 1992. *A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1992.
- NOVY R., DROTT D., YAEGER K., MIERENDORF R., 2001. *Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression*. *InNovations* 12, 1–3.
- OLINS P. O., DEVINE C. S., RANGWALA S. H., KAVKA K. S., 1988. *The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in Escherichia coli*. *Gene* 73, 227–235.
- OLINS P. O., RANGWALA S. H., 1989. *A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the lacZ gene in Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264, 16973–16976.
- PAN S., MALCOLM B. A., 2000. *Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3)*. *BioTechniques* 29, 1234–1238.
- PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, 2000, 20, str 533.
- ROSENBERG A. H., LADE B. N., CHUI D. -S., LIN S. -W., DUNN J. J., STUDIER F. W., 1987. *Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase*. *Gene* 56, 125–135.
- SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B., ERLICH H. A., 1988. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science* 239, 487–491.
- SEKTAS M., SZYBALSKI W., 2002. *Novel single-copy pETco-co vector with dual controls for amplification and expression*. *InNovations* 14, 6–8.
- STUDIER F. W., 1991. *Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system*. *J. Mol. Biol.* 219, 37–44.
- STUDIER F. W., MOFFATT B. A., 1986. *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- STUDIER F. W., ROSENBERG A. H., DUNN J. J., DUBENDORFF J. W., 1990. *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. *Methods Enzymol.* 185, 60–89.
- TABOR S., RICHARDSON C. C., 1985. *A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for the controlled exclusive expression of specific genes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 262, 1074–1078.
- WILD J., HRADECNA Z., SZYBALSKI W., 2001. *Single-copy/high-copy (SC/HC) pBac/oriV novel vectors for genomics and gene expression*. *Plasmid* 45, 142–143.