

СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО БИОТИНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ *IN VIVO* ПРИ ЭКСПРЕССИИ В *E. COLI*.

Ларионова М.Д.
Научный руководитель – к. б. н. Маркова С.В.

Сибирский федеральный университет

Биотин-авидиновая система, основанная на чрезвычайно высоком сродстве биотина к белку авидину, широко применяется в биологии и медицине для проведения иммуноанализов, иммобилизации и высокочувствительной детекции различных белковых молекул, а также очистки белков. Для получения биотинилированных белков используется химическое биотинилирование, которое часто приводит к инаktivации белка при модификации, кроме того, продукт реакции является гетерогенной фракцией. Однако возможен принципиально другой метод биотинилирования белков, с использованием методов генной инженерии.

Цель работы – создание экспрессионной конструкции для биотинилирования белков *in vivo* при экспрессии в *E. coli*. В *E. coli* имеется белок биотин-лигаза, биотинилирующий по специфическому сайту одну из субъединиц КоэнзимаА. При определении субстратной специфичности биотин-лигазы из *E. coli* методами фагового дисплея был получен ряд искусственных пептидов, эффективно биотинилируемых *in vivo*. Ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН две из полученных последовательностей были проверены при создании экспрессионной конструкции для биотинилирования обелина *in vivo* при экспрессии в *E. coli*. К сожалению, только 10-15% рекомбинантного обелина оказывалось биотинилированным. По-видимому, это связано с малым количеством молекул биотин-лигазы в *E. coli*. Предполагается, что включение гена биотин-лигазы в разрабатываемую экспрессионную конструкцию позволит более эффективно биотинилировать *in vivo* рекомбинантные белки.

Ген биотин-лигазы *birA* был амплифицирован специфическими праймерами при использовании в качестве матрицы геномной ДНК из *E. coli*. Далее фрагмент *birA* был очищен гель-электрофорезом и клонирован в экспрессионный вектор рЕТ19-Bio91OL сразу за геном обелина, содержащего фрагмент, кодирующий биотинилируемый пептид Bio91. Для одновременной экспрессии обоих белков с одного промотора был выбран вариант одновременной трансляции через стоп-старт перекрывание АТГА. Этот вариант реализован в геноме *E. coli* для трансляции *birA*. По данным литературы, стоп-старт перекрывание АТГА двух генов позволяет при очень эффективной трансляции первого белка получать второй белок в небольших количествах, что и требуется в данном случае. Стоп-старт перекрывание АТГА между обелином и *birA* было введено методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Все полученные генетические структуры подтверждены секвенированием.