

Получение мутантных σ^{70} -субъединиц РНК-полимеразы *E.coli* с делециями в N-концевой области.

Петкевич Кирилл Дмитриевич¹, Королева Ольга Николаевна², Друца Валерий Львович³

¹студент, ²старший научный сотрудник, к.х.н., ³ведущий научный сотрудник, к.х.н.

^{1,2}Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Москва, Россия

E-mail: ²koroleva@genebee.msu.su, ³druca@genebee.msu.su

Процесс транскрипции в *E.coli* осуществляется ферментом РНК-полимеразой (РНКП), состоящей из нескольких субъединиц – двух идентичных α , β , β' , ω и σ . Субъединица σ обеспечивает специфичность узнавания ферментом сигнала инициации транскрипции (промотора). На стадии экспоненциального роста клеток основной σ -субъединицей является σ^{70} . В ее структуре выявлен ряд функциональных доменов, ответственных за взаимодействие с кор-ферментом РНКП (районы 2.1 и 3.2) и с консенсусными элементами промоторов (районы 2.4 и 4.2). N-концевая область белка, включающая районы 1.1 (аминокислотные остатки 1-100) и 1.2 (аминокислотные остатки 101-126), а также неконсервативную область (аминокислотные остатки 127-370), является наименее изученной. Имеются данные о том, что район 1.1 препятствует связыванию свободной σ^{70} -субъединицы с ДНК. В настоящей работе с целью исследования N-концевой области σ^{70} -субъединицы генно-инженерными методами получен набор генов мутантных вариантов белка, имеющих делеции кодирующих нуклеотидных последовательностей в указанной области. Получены векторные ДНК для экспрессии мутантных субъединиц в виде белков, слитых с белковым модулем интеин-SBD (интеин + хитинсвязывающий домен), который предназначен для аффинного выделения составного белка на хитинсодержащей смоле с последующим отщеплением целевого белка уже без каких-либо технологических «довесков» (система IMPACT). Проведена экспрессия и аффинной хроматографией выделена серия препаратов высокоочищенных мутантных σ^{70} -субъединиц. Получены первые данные о свойствах этих мутантных σ^{70} -субъединиц в экспериментах *in vitro* (формирование специфических комплексов с промотором и транскрипция). Методом торможения в геле показано, что мутантная σ^{70} -субъединица, лишенная 75-ти N-концевых аминокислотных остатков, в отличие от своего природного аналога, способна специфически взаимодействовать с ДНК, содержащими консенсусные элементы промотора. На основе такого укороченного белка есть возможность создать экспресс-систему тестирования мутаций в σ^{70} -субъединице, влияющих на специфическое связывание различных промоторов.