

**Повышение экспрессии рекомбинантного пептида, закодированного в
1500011K16Rik Mus Musculus**

Швецова Екатерина Тимуровна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: katja.shvecova@gmail.com

Помимо мРНК, в организмах содержится большое количество некодирующих РНК, которые, тем не менее, выполняют различные функции. Однако, роль многих из них до сих пор не выяснена. Интересно, что в последовательности длинной некодирующей РНК мыши 1500011K16Rik имеется консервативная открытая рамка считывания длиной в 171 нуклеотид, и, значит, существует вероятность того, что с данной РНК всё-таки происходит трансляция белка. В связи с этим, имеет смысл экспрессировать пептид, закодированный в 1500011K16Rik, и выделить его в достаточном количестве для иммунизации. Антитела на интересующий нас пептид позволят не только проверить его наличие в клетках мыши, но и также откроет множество возможностей для дальнейшего изучения его функций (например, станет возможным исследовать его локализацию в клетках, проводить иммунопреципитацию и анализ белка методом Western Blot).

Экспрессию пептида было решено производить в *E. coli*. Экспрессионную плазмиду рЕТ33b+, кодирующую исследуемый пептид с шестью гистидинами на С-конце, трансформировали в BL21(DE3) штамм *E. coli*. Выделение и очистку белка проводили методом аффинного выделения с использованием Ni Sepharose 6 Fast Flow. Анализ результатов производили методами глицин-ПААГ электрофореза и Western Blot. Несмотря на успешную экспрессию гена, выход рекомбинантного белка оказался незначительным.

В связи с тем, что интересующий нас пептид имеет очень небольшую молекулярную массу (~6.5 кДа), довесок из шести гистидинов может достаточно сильно повлиять на свойства белка. Учитывая это, в методику получения белка внесли следующие изменения: сконструировали новую экспрессионную плазмиду, кодирующую пептид из 1500011K16Rik с шестью гистидинами на N-конце и с сайтом разрезания Tев-протеазы после него, оптимизировали методику разрушения клеток. Для анализа результатов использовали трициновый-ПААГ электрофорез (позволяющий разделять низкомолекулярные белки), для покраски белковых полос использовали чувствительную краску Instant Blue. В результате оптимизации, нам удалось выделить полноразмерный рекомбинантный белок с (6His-Tев) довеском, от которого в дальнейшем избавлялись специфическим протеолизом Tев-протеазой и второй аффинной очисткой на Ni Sepharose 6 Fast Flow.

В ближайшее время планируется подтвердить идентичность выделенного белка методом МАЛДИ-МС и оптимизировать условия выделения, чтобы достичь получения чистого белка в количестве, достаточном для иммунизации кролика.