

Jolita Bagdanavičiūtė

Naujų Mu transpozonų konstravimas ir jų panaudojimas baltymų struktūros tyrimuose

SANTRAUKA

Transpozonai nuo pat jų atradimo buvo plačiai naudojami analizės ir geno pertvarkos eksperimentuose *in vivo*, o neseniai pradėti taikyti ir *in vitro* eksperimentuose. Šiame darbe transpozonas Tn-Km buvo modifikuotas jo invertuotuose pasikartojimuose įterpiant unikalius restrikcijos endonukleazių MreI, Bsp1407I, BseXI ir AarI taikinius. Buvo nustatytas tokių modifikuotų transpozonų transpozicijos efektyvumas. Rezultatai parodė, kad naujai sukonstruoti transpozonai, kurių galuose yra identiškai invertuoti pasikartojimai su įvestais MreI, Bsp1407I ir BseXI taikiniai, yra vienodai efektyvūs kaip ir pradinis transpozonas Tn-Km. Tačiau mozaikiniai transpozonai, turintys skirtingus invertuotus pasikartojimus, transpozicijos reakcijoje yra mažiau efektyvūs. Panaudojant vieną iš naujai sukonstruotų transpozonų Tn-Km-Mre buvo atlikta *eco47IR* geno insercinė mutagenėzė, kurios išdavoje buvo nustatyti restrikcijos endonukleazės Eco47I rajonai, toleruojantys 7 aminorūgščių insercijas. Buvo identifikuoti keturi tokie rajonai, kurių bendras ilgis sudarė 8.6% nuo viso baltymo ilgio. Literatūriniai duomenys leidžia manyti, kad šie rajonai gali reprezentuoti paviršines baltymo sritis (pvz. kilpas). Remiantis gauta informacija buvo sukonstruoti penki naujos kartos pozityvios atrankos klonavimo vektoriai pJET1-3A, pJET1-1MCS, pJET1-2MCS, pJET1-3MCS, pJET1-4MCS. Ištyrus pJET1-3A savybes paaiškėjo, kad šis vektorius tinkamas klonavimo eksperimentams. Taip pat buvo nustatyta, kad pirmosios 12 Eco47I N gale išsidėsčiusių aminorūgščių liekanų nėra būtinos funkciniam restrikcijos endonukleazės aktyvumui. Dėl šios priežasties pJET1-1MCS, kuriame klonavimo polilinkeris įterptas iškart už minėtų 12 aminorūgščių, negali būti naudojamas kaip universalus pozityvios atrankos klonavimo vektorius, nes jame bus neįmanoma klonuoti DNR fragmentų, kurie atsitiktinai atstatys iniciatorinį metioniną.