

анализом потери массы. Такого рода испытания весьма продолжительны (до 6 мес.), что ограничивает их эффективность.

Для создания экспресс-метода испытания нами отработаны подходы к анализу степени деградации PLA-пленок с помощью методов вискозиметрии и кислотно-основного титрования. Для этого исследовали изменение степени вязкости и накопление молочной кислоты (продукта биodeградации PLA-пленок) в осветленной культуральной жидкости после совместного инкубирования бактерий с порошком полимера. Удовлетворительных зависимостей характеризующих процесс биodeградации полилактида на ранних этапах, получить не удалось.

Наилучшие результаты оценки степени биodeградации PLA-пленок получены с помощью оригинального подхода, в котором оценивается интенсивность обесцвечивания растворов роданида железа за счет вытеснения Fe^{3+} -ионов лактат-ионами. Для разработки этого метода проводится подбор питательных сред с целью минимизировать влияние определенных ионов на результаты реакции.

УДК663.15

И.С. Казловский, мл. науч. сотр.;
Д.В. Бурко, ст. науч. сотр., канд. биол. наук;
А.И. Береснев, ст. науч. сотр., канд. биол. наук;
А.И. Зинченко, проф., д-р биол. наук, член-корр.
(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск)

СОЗДАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ХИМЕРНОГО БЕЛКА, ВКЛЮЧАЮЩИЙ АФФИННЫЙ ДОМЕН К ДНК – SSO7D И T7-РНК-ПОЛИМЕРАЗУ

В настоящее время в Республике Беларусь успешно осваивается методический прием получения препаратов протеиновой природы (ферментов, интерферонов, антигенов, антител, гормонов) с использованием генно-инженерного инструментария (выделение и клонирование генов, введение генов в клетки бактерий-реципиентов и наработка продукта протеиновой природы в трансформированных клетках).

Несмотря на существенные успехи, достигнутые в области генно-инженерной биотехнологии, этот подход имеет ряд ограничений. Поэтому, в последнее время в качестве альтернативного инструмента для получения рекомбинантных соединений протеиновой природы приоб-

ретают все большую популярность системы бесклеточного синтеза белка, в частности системы, основанные на лизатах растительных, дрожжевых и, особенно, бактериальных клеток.

Система бесклеточного синтеза белка предусматривает транскрипцию гена и трансляцию мРНК *in vitro* – в лизате клеток, в который вносят рекомбинантную ДНК, аминокислоты, нуклеотиды, кофакторы, функционально важные белки и АТФ-регенерирующую систему. Эндогенные ДНК и мРНК при этом удаляются. К основным функционально важным белкам относится РНК-полимераза бактериофага T7, которая синтезирует мРНК со специфичных сайтов узнавания рекомбинантной ДНК.

Целью данной работы явилось создание штамма-продуцента химерного белка Sso7d-T7-РНК-полимеразы, содержащий ДНК-аффинный домен SSo7d, T7-РНК-полимеразу и октагистидиновый олигопептид, а также получение высокоочищенного препарата фермента с использованием метало-аффинной хроматографии.

В результате выполнения работы ген бактериофага T7, кодирующий РНК-полимеразу и ген *SSO_RS12375*, кодирующий SSo7d-домен, был выделен методом ПЦР и встроен в вектор pET42a(+). Созданной конструкцией были трансформированы клетки *Escherichia coli* BL21(DE3), что привело к получению нового рекомбинантного штамма *E. coli* pET42-T7S – продуцента химерного белка Sso7d-T7-РНК-полимеразы, содержащей на С-конце молекулы октагистидиновый олигопептид. Такая первичная структура фермента, позволяет выделять его из клеточного лизата в одну стадию, используя аффинную хроматографию на смоле Ni-NTA. Полученный штамм-продуцент обладает продуцирующей способностью в отношении растворимой формы Sso7d-T7-РНК-полимеразы около 50 мг/л культуральной жидкости. При этом удельная активность полученного фермента составляет 80 ед/мг белка. Результаты, полученные в данной работе, будут применены для реконструкции системы бесклеточного синтеза белка.