

**ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СУЛЬФАТОМ АММОНИЯ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ
ОЧИСТКИ МОДЕЛЬНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ**

В качестве альтернативы аффинной хроматографии исследован метод высаливания для первичной очистки рекомбинантных белков, не содержащих гистидиновой метки. Метод основан на снижении растворимости белков при повышении концентрации сульфата аммония. Ионы соли конкурируют с белками за молекулы воды, нарушая их гидратную оболочку. Это приводит к вскрытию гидрофобных участков и агрегации молекул белка. Поскольку разные белки осаждаются при различной концентрации соли, то возможно их фракционирование. Проводился систематический подбор концентраций сульфата аммония для установления условий селективного осаждения модельных белков *Lira Precursor* (13,5 kDa), *CRM197* (60,4 kDa), *SSB* (19 kDa) при минимальном содержании примесных белков.

В ходе работы мы осуществляли лизис клеточной суспензии (10 мг белка в 100 мкл суспензии), после чего осуществляли центрифугирование полученного лизата. Далее к полученному супернатанту добавляли сульфат аммония до насыщения в 30 % и перемешивали на ротаторе, центрифугировали и анализировали с помощью электрофореза полученный осадок. Постепенно повышали его концентрацию до 90 % с шагом 10 % и оценивали, где выпадает белок с наименьшим количеством примесей (рисунок 1).

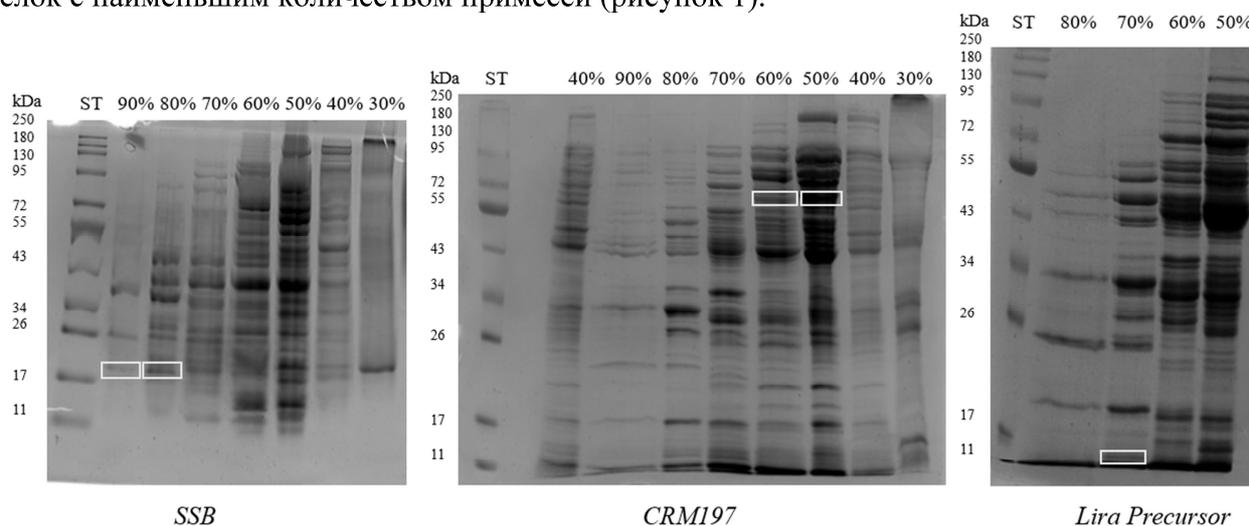


Рисунок 2 – Электрофореграмма образцов после высаливания при различном содержании сульфата аммония

Для каждого из исследуемых белков был успешно подобран индивидуальный оптимальный диапазон насыщения, обеспечивающий максимальный выход целевого продукта с минимальным количеством примесей:

- белок *SSB* наиболее эффективно осаждался от 80 до 90 % насыщения,
- белок *Lira Precursor* демонстрировал максимальную чистоту при 70 % насыщения,
- белок *CRM197* осаждался от 50 до 60 % насыщения.

Таким образом, метод доказал свою надежность для первичного очищения белков и может быть использован в качестве начального этапа в многоступенчатых схемах очистки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ № Х23КУБ-018 от 01.12.2023.

ЛИТЕРАТУРА

1. Duong-Ly K. C. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation / K. C. Duong-Ly, S. B. Gabelli // *Methods in Enzymology*. – 2014. – Vol. 541. – P. 85–94.