

**ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА ГИБРИДНОЙ ДНК ПОЛИМЕРАЗЫ *PFU-SSO7D*  
ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЕНАТУРАЦИИ НА УДАЛЕНИЕ  
ПРИМЕСТНЫХ БЕЛКОВ**

Гибридная ДНК-полимераза *Pfu-Sso7d* является рекомбинантным полипептидом с молекулярной массой около 100 кДа, состоящим из соединенных термостабильной ДНК-полимеразы *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) и ДНК-связывающего белка термофильных архей вида *Sulfolobus solfataricus* (*Sso7d*) [1].

После экспрессии целевого белка в клетках *BL21(DE3)/pET-28b(+)* проводили их гомогенизацию с RMSF (Фенилметилсульфонил фторид) и центрифугирование. Полученный супернатант подвергали тепловой денатурации для очистки. Исследовали зависимость эффективности осаждения примесей от температуры при фиксированном времени инкубации (15 мин). Анализировали влияние продолжительности термообработки (до 60 мин) при постоянной температуре 70 °С для разных объемов образца (рисунок 1). После каждого воздействия проводили центрифугирование для отделения денатурированных примесей от целевого белка.

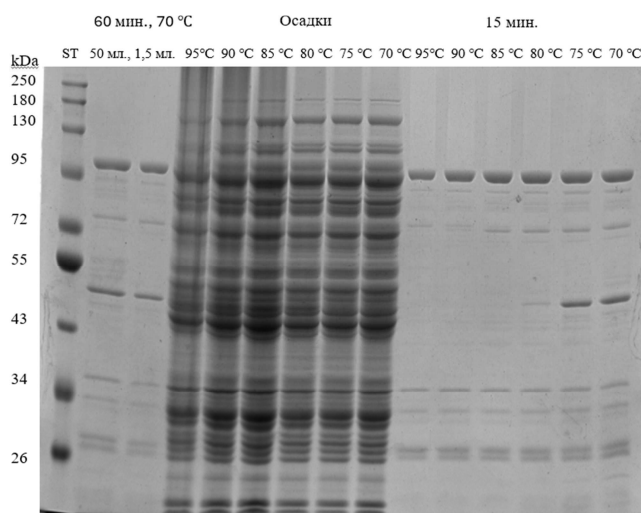


Рисунок 1 – Электрофореграмма образцов после термической денатурации при различных температурах, их осадков, образцов с увеличенным временем обработки температурой

В результате оптимизации первичной очистки рекомбинантного белка методом термической денатурации установлено, что инкубация при 85 °С является оптимальным режимом, обеспечивающим максимальное удаление примесных белков при полном сохранении целевого продукта, что подтверждается его отсутствием в осадке и минимальными потерями. Также можем сделать вывод, что объем, подвергаемый температурной денатурации стоит учитывать при оптимизации методики очистки полимеразы, т. к. чем он меньше, тем менее выражено влияние времени воздействия температуры (60 мин. оптимальны для образца 50 мл, 15 мин. – для 1,5 мл). Для полного удаления низкомолекулярных примесей и концентрирования конечного продукта проводят дальнейшую очистку, включающую металлоаффинную хроматографию и последующую ультрафильтрацию на мембранах с пористостью 50 кДа.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro / Y. Wang, D. E. Prosen, L. Mei [et al.] // *Nucleic acids research.* – 2004. – Vol. 32, № 3. – P. 1197–1207.