

УДК 577.122.085

Е.С.Божокина (5 курс, каф. БФ), П.С.Грудинкин, м.н.с. (ИНЦ РАН)

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА GST-КАРИОФЕРИН $\alpha 1$

Эукариотическая клетка характеризуется наличием двух отдельных компартментов - ядерного и цитоплазматического, разделенных ядерной оболочкой, и содержанием большей части генетического материала в ядре, ограниченным двумембранной оболочкой. Ядерная оболочка пронизана множеством ядерных поровых комплексов, которые обеспечивают обмен макромолекулами между двумя компартментами — ядром и цитоплазмой. Ядерно-цитоплазматический транспорт в основном активный, сигнал-опосредованный процесс, идущий довольно интенсивно, он подразумевает импорт из цитоплазмы жизненно необходимых ядерных белков (например, гистонов и транскрипционных факторов), и также экспорт транскрибированных в ядре т-, р- и м-РНК в форме рибонуклеопротеинов в цитоплазму, где они участвуют в трансляции [1].

Целью данной работы явилось выделение и очистка рекомбинантного белка GST-кариоферин $\alpha 1$. Представители семейства кариоферинов α непосредственно связывают сигналы ядерной локализации (NLS) в составе импортируемых в ядро молекул.

Кариоферин $\alpha 1$ (NPI-1) был экспрессирован в виде химерного белка, сшитого с глутатион-S-трансферазой (GST-fusion) в векторе pGEX-5X-3. В работе использовали штаммы *E. coli* BL21(DE3). Для эффективной экспрессии рекомбинантного кариоферина $\alpha 1$ была проведена трансформация бактерий вспомогательной плазмидой pDC952., кодирующей редкую для бактерий ArgU тРНК. После вариации условий экспрессии химерного белка, были выбраны следующие условия - стимуляция 0,5 mM ИПТГ при 30⁰С в течение ночи. Бактериальные клетки выращивались в 2 литрах LB с добавлением 20 mM глюкозы, 100 мкг/мл ампициллина и 35 мкг/мл хлорамфеникола.

Очистка производилась аффинной хроматографией на глутатион-сефарозе согласно подобранным оптимальным условиям сорбции (в качестве буфера для инкубации с носителем был взят PBS с pH 7,6) и промывки (сорбент с иммобилизованным белком промывали последовательно растворами, содержащими 1 % Тритона X-100 и 1 M NaCl) с элюцией (оптимальной для элюции оказалась концентрация глутатиона равная 50 mM в буфере). Общее количество очищенного белка составило примерно 4 мг.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gorlich D., Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1999. 15:607-660.