

УДК 577.152.321

А.М.Новикова (5курс, каф. ЭФ), Д.В. Карелов, м.н.с. (ОМРБ ПИЯФ РАН)

ОЧИСТКА ФЕРМЕНТА  $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ  
(ТРЕГАЛОЗО-6-ФОСФАТГИДРОЛАЗЫ)  
ИЗ ТЕРМОРЕЗИСТЕНТНОГО ШТАММА *BACILLUS SP.* GP16

Выделяемый фермент принадлежит к классу  $\alpha$ -глюкозидаз и обладает необычной для них способностью гидролизовать  $\alpha$ -(1,1) связь субстрата. В настоящее время мало известно о механизме действия и пространственной структуре этого белка. Для решения этих задач необходимо получить фермент в чистом виде, без потери его активности. Была проведена работа по оптимизации метода поэтапной очистки фермента трегалозо-6-фосфатгидролазы из терморезистентного штамма *Bacillus sp.* Амплифицированный полноразмерный ген фермента трегалозо-6-фосфат гидролазы, клонированный в экспрессионном векторе PET 21b, вводился в клетки *Escherichia coli* (штам BLR) методом электропорации. Были подобраны условия экспрессии клонированного гена: концентрация индуцирующего агента IPTG (0,5 мМ) и время индукции (2 часа). Экспрессия исследуемого белка при данных условиях составляет около 50 %. Так же была проверена терморезистентность полученного фермента в грубом клеточном лизате – фермент не денатурирует при температуре вплоть до 60° С.

Таблица. Очистка белка.

N	стадии очистки	$\Sigma$ ОП260	$\Sigma$ ОП280	$\Sigma$ количество белка, мг (по Лоури)	$\Sigma$ активность трегалозо-6-фосфат гидролазы
1	Разрушение клеток ультразвуком, центрифугирование	4500	3200	650	4500
2	Термообработка (t=60° С, 30 мин), центрифугирование	3500	1900	80	4000
3	Хроматография (DEAE-SEPHAROSE)	85	160	65	3500

К 5 мл клеток BLR (Rec<sup>-</sup>, TrcC<sup>+</sup>) добавили 20 мл буфера: 50 мМ Tris pH 7,5; 1 мМ ЭДТА. Клетки вскрывались с помощью ультразвуковой установки. Раствор клеток при температуре 0° С подвергался воздействию ультразвуком 40 раз по 12 сек. Далее раствор центрифугировали 30 мин при 40000 g. Супернатант инкубировали при температуре 60° С 30 мин. Далее центрифугировали 30 мин при 20000 g. К 12 мл супернатанта добавили 48 мл 100 % сульфата аммония, оставили на ночь при 4° С. Раствор центрифугировали 30 мин при 20000 g. Осадок ресуспензировали в 6,5 мл 20 мМ Tris pH 7,5. Раствор белка обессоливали центрифугированием с использованием мембраны biotax-30KMWL. На хроматографическую колонку (10 мм X100 мм) с носителем DEAE SEPHAROSE Cl-6B, уравновешенную 20 мМ Tris pH 7,5, наносили раствор белка, затем колонку промывали 20 мл 20 мМ Tris pH 7,5 при скорости 10 мл/ч. Белок смывали 200 мл линейного градиента 0-0,5 М NaCl при скорости 10 мл/ч. TrcC смывался с колонки при 0,2 М NaCl. Измеряли ОП фракций после хроматографии при 260 и 280 нм. Объединили фракции с 36 по 39, диализовали против 20 мМ Tris pH 7,5 и сконцентрировали белок (на centrifuge filter units) до концентрации 10 мг/мл белка.

**Выводы.**

В ходе работы был получен чистый белок, что можно видеть на SDS денатурирующем фореze. В течение выделения произошла незначительная потеря активности белка.