

# ОТРИМАННЯ ТАQ-ПОЛІМЕРАЗИ В КУЛЬТУРІ *ESCHERICHIA COLI*

Прохоренко Д.К.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, [pdmytro378@gmail.com](mailto:pdmytro378@gmail.com)

<sup>2</sup>ТОВ «ХЕМА», Київ, Україна



## Abstract

*The constructs and methods for analyzing the obtained recombinant protein of Taq polymerase are described in this work. The obtained Taq polymerase, with a mass of 94 kDa and free of DNA nuclease contaminants, exhibited a purity exceeding 90% and an activity level comparable to that of the commercial enzyme sample.*

**Keywords:** PCR, recombinant protein, *E.coli*, Taq DNA polymerase.

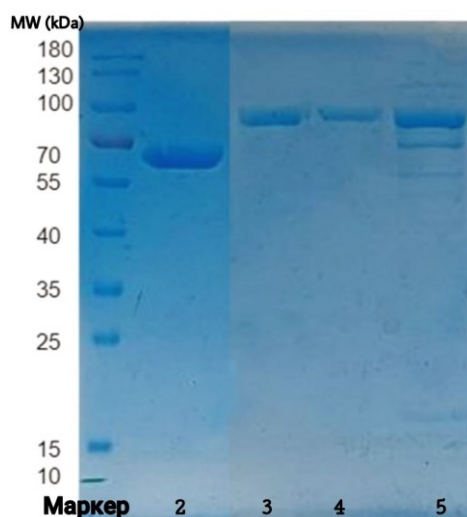
**Вступ.** У зв'язку з пандемією вірусу *SARS-CoV-2* зростає потреба у високоточних аналізах з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Окрім виявлення вірусу *SARS-CoV-2* метод ПЛР широко застосовують у медицині для діагностики вірусів гепатитів, герпесів, папіломатозу та статевих інфекцій, зокрема хламідіозу, уреоплазмозу, трихомоніазу та ін.

ПЛР має високий ступінь специфічності та чутливості оскільки дозволяє кількісно виміряти вміст специфічного фрагменту ДНК збудника хвороби у пробі, а не антитіл до нього. На сьогодні для ПЛР переважно використовується комерційна Таq-полімераза, яка є дороговартісною, тому зростає потреба у розробці швидкого та недороговартісного методу отримання ферменту Таq-полімерази в лабораторних умовах [1].

Метою роботи було отримання ферменту Таq ДНК-полімерази в культурі *E. coli*, відтворюваним та недорогим методом.

**Матеріали і методи.** Для одержання повнорозмірної Таq полімерази з N-термінальною полігістидиною міткою вбудували генетично модифікований плазмідний вектор рЕТ-30a(+) в культуру *Escherichia coli* штаму BL21. Здатність до експресії цільового протеїну Таq полімерази перевіряли методом імуноферментного аналізу. Рекомбінантний протеїн виділяли з супернатанту отриманого з переплазматичного екстракту бактерій після руйнування біомаси ультразвуком з додаванням лізоциму в концентрації 0,1%. Для очистки ферменту використали метод метал-афінної хроматографії та гель хроматографію на сорбенті «Sephacryl S-200 HR» з метою позбавлення від домішок. Концентрацію отриманої Таq-полімерази вимірювали на флюорометрі Qubit, чистоту протеїну аналізували методом гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі [2, 3].

**Результати та обговорення.** Аналіз чистоти отриманої Таq полімерази порівнювали зі стандартом бичачого сироваткового альбуміну. Зразки наносили у концентрації у 5 мкг та 10 мкг на лунку (Рис. 1 лунки 3, 4) для референсу використали зразок Таq-полімерази, який не був доочищений методом гель-хроматографії (лунка 5). Встановлена наявність одного білка розміром 94 кДа (лунки 3, 4), без домішок ДНК-нуклеази. Чистота отриманого рекомбінантного ферменту, в порівнянні зі стандартом бичачого сироваткового альбуміну перевищує 90%.



**Рис.1** Аналіз чистоти отриманої Таq-полімерази методом гелю електрофорезу в поліакриламідному гелі: 1 - маркер Page Ruler Marker #26616 ThermoScientific; 2 - альбуміновий стандарт #23209 ThermoScientific в концентрації 10 мкг на лунку, 3 - повнорозмірна Таq-ДНК полімераза в концентрації 5 мкг на лунку (MW=94 kDa), 4 - повнорозмірна Таq-ДНК полімераза в концентрації 10 мкг на лунку, 5 - Повнорозмірна Таq-ДНК полімераза до очистки методом гелю фільтрації в концентрації 10 мкг на лунку.

Для перевірки роботи отриманого ферменту, його використали для ампліфікації плазмідного вектору на основі рUC19 з доданими фрагментами ДНК.

При проведенні ПЛР на здатність до ампліфікації отриманого нами протеїну, встановлено, що отриманий фермент не відрізняється за активністю від зразку комерційної Таq-полімерази. Метод, котрий базується на отриманні ферменту з використанням нікол-афінної хроматографії, та подальшою очисткою гелю фільтрацією, є ефективним, дешевим та придатним для використання в лабораторіях.

**Висновки.** Таким чином отримана Таq-полімераза масою в 94 кДа, що не містить домішок ДНК-нуклеази зі ступенем чистоти, що перевищує 90% та не відрізняється за активністю від зразку комерційного ферменту.

### Список використаної літератури:

1. Miura, Masashi; Tanigawa, Chihiro; Fujii, Yoshito; Kaneko, Satoshi (2013). Comparison Of Six Commercially-Available Dna Polymerases For Direct Pcr. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(6), 401–406. doi:10.1590/S0036-46652013000600005
2. Wu, S., Beard, W. A., Pedersen, L. G., & Wilson, S. H. (2013). Structural Comparison of DNA Polymerase Architecture Suggests a Nucleotide Gateway to the Polymerase Active Site. *Chemical Reviews*, 114(5), 2759–2774. doi:10.1021/cr3005179
3. Nosaibah Samman, Khawlah Al-Muhalhil, Atef Nehdi, «A simple and efficient method for Taq DNA polymerase purification based on heat denaturation and affinity chromatography, *Journal of King Saud University - Science*, Volume 35, Issue 3, 2023, 102565, ISSN 1018-3647, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102565>.