

СЕКЦІЯ Х. БІОЛОГІЯ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ОТРИМАННЯ ЗВОРотної ТРАНСКРИПТАЗИ MMLV В КУЛЬТУРІ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ СТВОРЕННЯ ТЕСТ СИСТЕМ

Дмитро Прохоренко

ТОВ «ХЕМА» вул. Академіка Єфремова 23, 3179, м. Київ, Україна

У зв'язку з пандемією SARS-CoV-2 значно зросли потреби у використанні тест систем для виявлення нуклеїнових кислот *in vitro*. В лабораторній діагностиці для виявлення геному РНК-вмісних вірусів застосовують метод полімеразної ланцюгової реакції для якого необхідний ензим зворотна транскриптаза. Зворотна транскриптаза (ревертаза) або РНК-залежна ДНК-полімераза (КФ 2.7.7.49) каталізує синтез ДНК на матриці РНК геному вірусу та забезпечує процеси передачі генетичної інформації від РНК до ДНК (процес зворотний до транскрипції). У результаті роботи зворотної транскриптази на основі клітинної матричної РНК (мРНК) утворюється комплементарна ДНК (кДНК). Представлені на ринку комерційні зразки даного ензиму, зокрема moloney murine leukemia virus (MMLV) ревертази є високовартісними. Тому одержання значної кількості зворотної транскриптази з мінімальними фінансовими затратами для використання як для наукових досліджень в галузі молекулярної біології, так і для створення вітчизняних тест систем для діагностики SARS-CoV-2 на сьогодні є надзвичайно актуальним.

Метою роботи було удосконалення методики отримання зворотної транскриптази та її характеристика.

Для отримання зворотної транскриптази використовували методи генної інженерії, афінної хроматографії та імуноферментного аналізу. Концентрацію отриманого протеїну вимірювали за допомогою тест системи на флуориметрі Qubit 4 (Виробник Thermo Fisher Scientific). Чистоту білку визначали методом гель-електрофорезу поліакриламідного гелю в денатуруючих умовах. Здатність отриманої MMLV-ревертази до синтезу кДНК перевіряли за методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (reverse transcription quantitative real-time (RT-qPCR)).

Для отримання MMLV-ревертази у плазмідну конструкцію рЕТ-30a(+) вбудовували послідовність (Met+MMLV-ревертаза+РАРАР (пролін-аланіновий лінкер)+His6) для синтезу повнорозмірної зворотної транскриптази модифікованою полі-гістидиновою С-термінальною міткою. Отриману плазмиду вносили в культуру *Escherichia coli* штаму Rosetta методом електропорації та використовували селекцію суперпродуцента. Відповідно до одержаних результатів використали бактеріальну лінію з найбільшою експресією MMLV-ревертази.

Після завершення селекції, з метою отримання значної кількості біоматеріалу для подальших досліджень проводили ферментацію. Отриману біомасу руйнували ультразвуком при температурі від +2 до +8°C. Подальшу очистку цільового протеїну з лізату клітин проводили методом метал-афінної хроматографії. Протеїн елюювали розчином 0,25 М імідазолу в буферній системі трис (гідроксиметил) амінометана 0,015 М рН 8,3.

Для перевірки чистоти зворотної транскриптази на наявність в ній домішок

інших пептидів зразок ензиму наносили на поліакриламідний гель у концентраціях в мкг (Рис. 1, 2) та 10 мкг (Рис. 1, 3) на лунку.

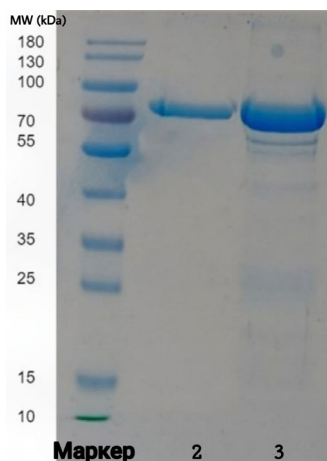


Рис. 1. Аналіз чистоти отриманої зворотної транскриптази (72 кДа) методом гелю електрофорезу в поліакриламідному гелі: маркер) Page Ruler Marker #26616 ThermoScientific; 2- зворотня транскриптаза в концентраті 5 мкг на лунку; 3- зворотня транскриптаза в концентраті 10 мкг на лунку

Отже, згідно з даними аналізу в поліакриламідному гелі отримали високочистий ензим масою 72 кДа.

Для перевірки здатності отриманої ревертази до синтезу кДНК на матриці РНК проводили постанову RT-qPCR для визначення наявності нуклеїнових кислот вірусу гепатиту С людини. Для порівняння використовували ревертазу «Faron» MD040. Як видно з Рис. 2 ампліфікація ДНК відбувалася у всіх випадках, що означає здатність ферменту до каталітичного синтезу кДНК. Початок флуоресценції на однакових циклах в порівнянні зі зразком комерційної ревертази свідчить про ефективність роботи ферменту. Відмінність отриманих значень відносної флуоресценції можна пояснити різними концентраціями речовин у полімеразній суміші (Рис.2).

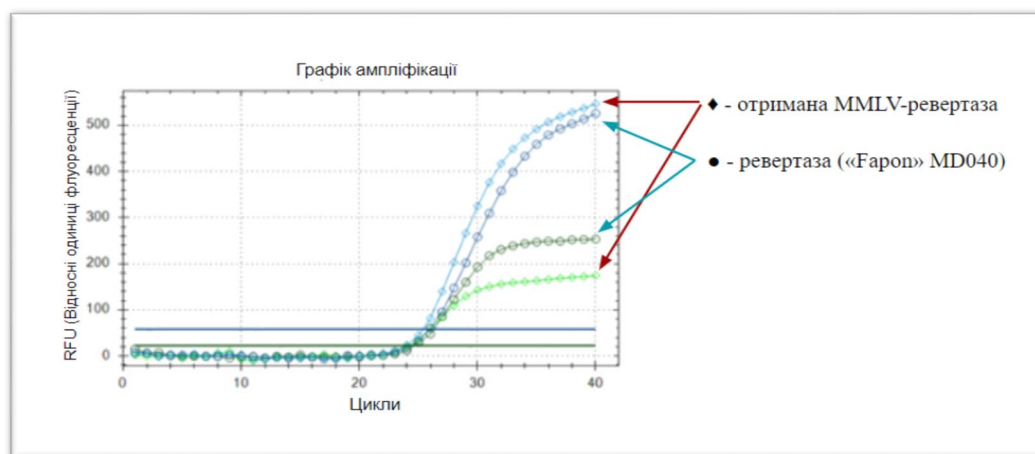


Рис. 2. Оцінка здатності отриманої MMLV-ревертази до каталітичного отримання кДНК на матриці РНК методом RT-qPCR

Таким чином, нами було отримано MMLV-ревертазу, яка згідно результатів гелю електрофорезу та RT-qPCR відповідає необхідній чистоті та здатності до каталітичного отримання кДНК на матриці РНК та її використання для подальших досліджень в молекулярній біології та для створення тест систем.