

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА РЕКОМБИНАНТНОЙ МУТАНТНОЙ ТАQ ПОЛИМЕРАЗЫ

П.В. Колосов<sup>1</sup>, Д.Н. Щербаков<sup>2</sup>

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Большое практическое значение имеет внедрение в практику современных технологий культивирования продуцентов с целью получения рекомбинантных ферментов. Оптимизация процесса культивирования является эффективным методом повышения биосинтетической активности продуцентов. Оптимальные условия культивирования можно подобрать двумя способами: методом эмпирического подбора и с использованием методов математического планирования эксперимента [1].

Планирование эксперимента с использованием метода полного факторного эксперимента позволяет варьировать одновременно несколько факторов и получать количественные оценки как основных факторов, так и эффектов взаимодействия между ними, и получаемые результаты в этом случае характеризуются меньшей ошибкой, чем традиционные методы однофакторного исследования [2–5].

**Цель работы** – оптимизация условий культивирования штамма *E. coli*, продуцента рекомбинантной Taq полимеразы с аминокислотной заменой D732N методом полного факторного эксперимента.

В работе использован рекомбинантный штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий рекомбинантную плазмиду с геном мутантной Taq полимеразы pET21a-D732N (рис. 1).

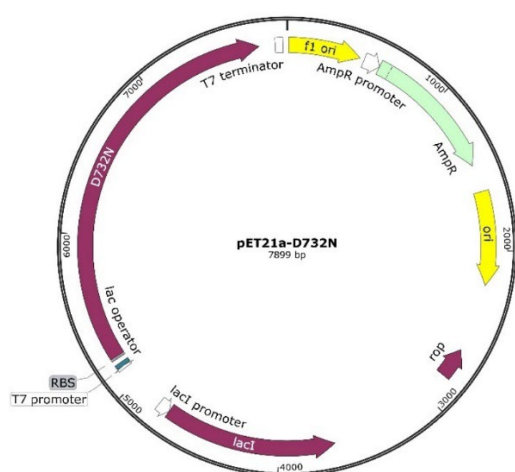


Рис. 1 – Генетическая карта вектора, кодирующего мутантную Taq полимеразу D732N

Из литературных источников [6] и результатов предварительных опытов установлено, что на уровень экспрессии белков в *E. coli* BL21(DE3) оказывают влияние следующие факторы: температура культивирования (Т), °С – фактор  $X_1$ ; концентрация индуктора в питательной среде (IPTG), мМ – фактор  $X_2$ ; скорость перемешивания – фактор аэрации (RPM), об/мин – фактор  $X_3$ ; продолжительность культивирования, (t), ч – фактор  $X_4$ . С учетом предварительных опытов составлена матрица планирования приведенная в таблице 1.

Количество опытов N определяли по количеству факторов k в соответствии с выражением  $N = 2^k = 2^4 = 16$ . После реализации полного факторного эксперимента строили линейную математическую модель вида:  $y = b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_4 x_4 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{14} x_1 x_4 + b_{23} x_2 x_3 + b_{24} x_2 x_4 + b_{34} x_3 x_4 + b_{123} x_1 x_2 x_3 + b_{124} x_1 x_2 x_4 + b_{134} x_1 x_3 x_4 + b_{234} x_2 x_3 x_4 + b_{1234} x_1 x_2 x_3 x_4 + b_0$ , где  $b_i$  – коэффициенты регрессии. Для расчета коэффициентов регрессии этой математической модели строили расширенную матрицу планирования и результатов экспериментов (табл. 2, 3).

Таблица 1. Матрица планирования

Наименование	Фактор		Уровни варьирования			Интервал варьирования	Расчет фактора
	Обозначение						
	натуральное	кодировое	+1	0	-1		
Температура, Т	$X_1$	$x_1$	37	26,5	16	10,5	$x_1 = (T - 26,5)/10,5$
Индуктор, IPTG	$X_2$	$x_2$	1	0,55	0,1	0,45	$x_2 = (IPTG - 0,55)/0,45$
RPM	$X_3$	$x_3$	250	205	160	45	$x_3 = (RPM - 205)/45$
Продолжит., t	$X_4$	$x_4$	20	11	2	9	$x_4 = (t - 11)/9$

Таблица 2. Расширенная матрица планирования

№ опыта	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>
1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
2	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
3	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
4	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
5	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
10	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1
11	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
12	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
13	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1
15	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
16	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1

Для культивирования клеток *E. coli* BL21(DE3) и синтеза белка применяли жидкую питательную среду LB. Индивидуальные колонии культивировали в шейкер-инкубаторе в среде LB при 37 °C при 200 об/мин до оптической плотности 0,4 при 600 нм. Далее индукцию проводили параллельно при 16 °C и 37 °C и с различным (0,1 мМ и 1 мМ) содержанием индуктора ИПТГ при 160 об/мин и 250 об/мин в течение 2 ч и 20 ч. Затем производили отбор культуральной жидкости объемом 1 мл, отделяли биомассу центрифугированием при 5000g при 4 °C в течении 20 мин., удаляли супернатант и ресуспендировали в 100 мкл раствора, содержащего 8М мочевины, 500 мМ хлорида натрия и 50 мМ дигидрофосфата натрия, с pH 7,4. Идентификацию Taq полимеразы в биомассе осуществляли посредством разделения белков в ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси (рис. 2). Обработку электрофореграмм проводили в программе GelAnalyzer 19.1 [7]. В программе есть возможность стандартизировать интенсивность бендов по BSA, и итоговое содержание белка экстраполировалось в пересчете на BSA. Результаты приведены в таблице 3.

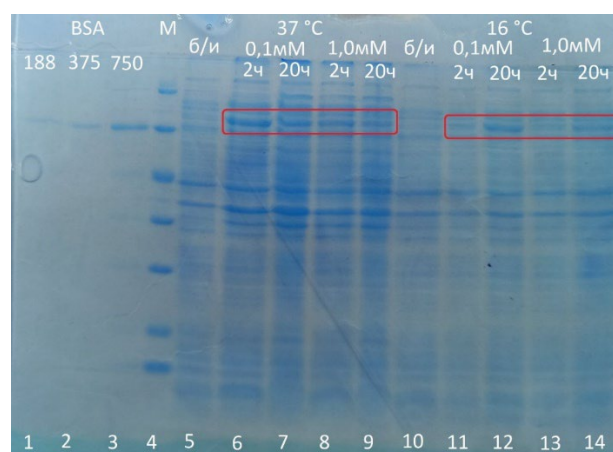


Рис. 2 – Электрофореграмма образцов после индукции: 1 – BSA 188 нг; 2 – BSA 375 нг; 3 – BSA 750 нг; 4 – маркер; 5 – образец без индуктора культивируемый при 37 °C; 6–9 – образцы культивируемые при 37 °C, при различной продолжительности и концентрации индуктора; 10 – образец без индуктора, культивируемый при 16 °C; 11–14 – образцы культивируемый при 16 °C, при различной продолжительности и концентрации индуктора.

Таблица 3. Результаты экспериментов

№ опыта	Натуральные значения переменных				Содержание белка, нг
	T	IPTG	RPM	t	
1	16	0,1	160	2	975
2	16	1	160	2	910
3	16	0,1	160	20	2401
4	16	1	160	20	1781
5	16	0,1	250	2	1573
6	16	1	250	2	1112
7	16	0,1	250	20	1128
8	16	1	250	20	901
9	37	0,1	160	2	523
10	37	1	160	2	450
11	37	0,1	160	20	910
12	37	1	160	20	923
13	37	0,1	250	2	1080
14	37	1	250	2	922
15	37	0,1	250	20	910
16	37	1	250	20	765

Коэффициенты при независимых переменных указывают на степень влияния факторов (таблица 4).

Таблица 4. Коэффициенты регрессии

b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>12</sub>	b <sub>13</sub>	b <sub>14</sub>	b <sub>23</sub>	b <sub>24</sub>	b <sub>34</sub>	b <sub>123</sub>	b <sub>124</sub>	b <sub>134</sub>	b <sub>234</sub>	b <sub>1234</sub>
-45	-108	268	136	-15	-139	-259	-63	-14	69	15	45	-110	-26	54

Таким образом, выявлено, что больше всего на уровень продукции целевого белка влияет скорость перемешивания, т. Е. фактор аэрации, причем повышении RPM в диапазоне 160–250 об/мин должно приводить к увеличению содержание белка. Вторым по значимости является парный фактор температуры и продолжительности, при одновременном увеличении или уменьшении этих факторов уровень синтеза белка понижается, и, соответственно, чтобы повысить уровень синтеза необходимо увеличивать продолжительность наработки при низких температурах, либо уменьшать продолжительность при высоких температурах. Также значимым фактором оказалась продолжительность культивирования: при увеличении продолжительности, содержание белка увеличивается.

### Литература

1. Кареткин Б.А. Факторный эксперимент для оптимизации условий предварительной обработки питательной среды / Б.А. Кареткин, Т.С. Катаева, Д.В. Баурин, В.Д. Грошева, И.В. Шакир, В.И. Панфилов // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11–1. – С. 13–19; URL: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?Id=35469> (дата обращения: 18.08.2023).
2. Бирюков В.В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В.В. Бирюков, В.М. Кантере. – М. : Наука, 1985. – 296 с.
3. Bajpai R.K. A mechanistic model for penicillin production / R.K. Bajpai, M. Reuss // J. Chem. Technol. And Biotechnol. – 1980. – Vol. 30. – Pp. 332–344.
4. Ettler P. Determination of the optimal feeding regime during biosynthesis of erythromycin / P. Ettler, J. Votruba // Folia Microbiol. – 1980. – Vol. 25. – Pp. 424–429.
5. Белаш Е.А. Анализ влияния независимых параметров на продукцию рекомбинантного химозина лоса дрожжами *Kluyveromyces lactis* / Е.А. Белаш, П.В. Колосов, Д.В. Балабова, С.В. Беленькая, Д.Н. Щербаков // В книге: IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. Сборник тезисов. – Новосибирск, 2022. – С. 82–83.
6. Маслов Р.Д. Получение мутантных форм Таq-полимеразы: выпускная квалификационная работа бакалавра по направлению подготовки: 06.03.01 – Биология / Р.Д. Маслов. – Барнаул, 2022.
7. GelAnalyzer 19.1 ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc.