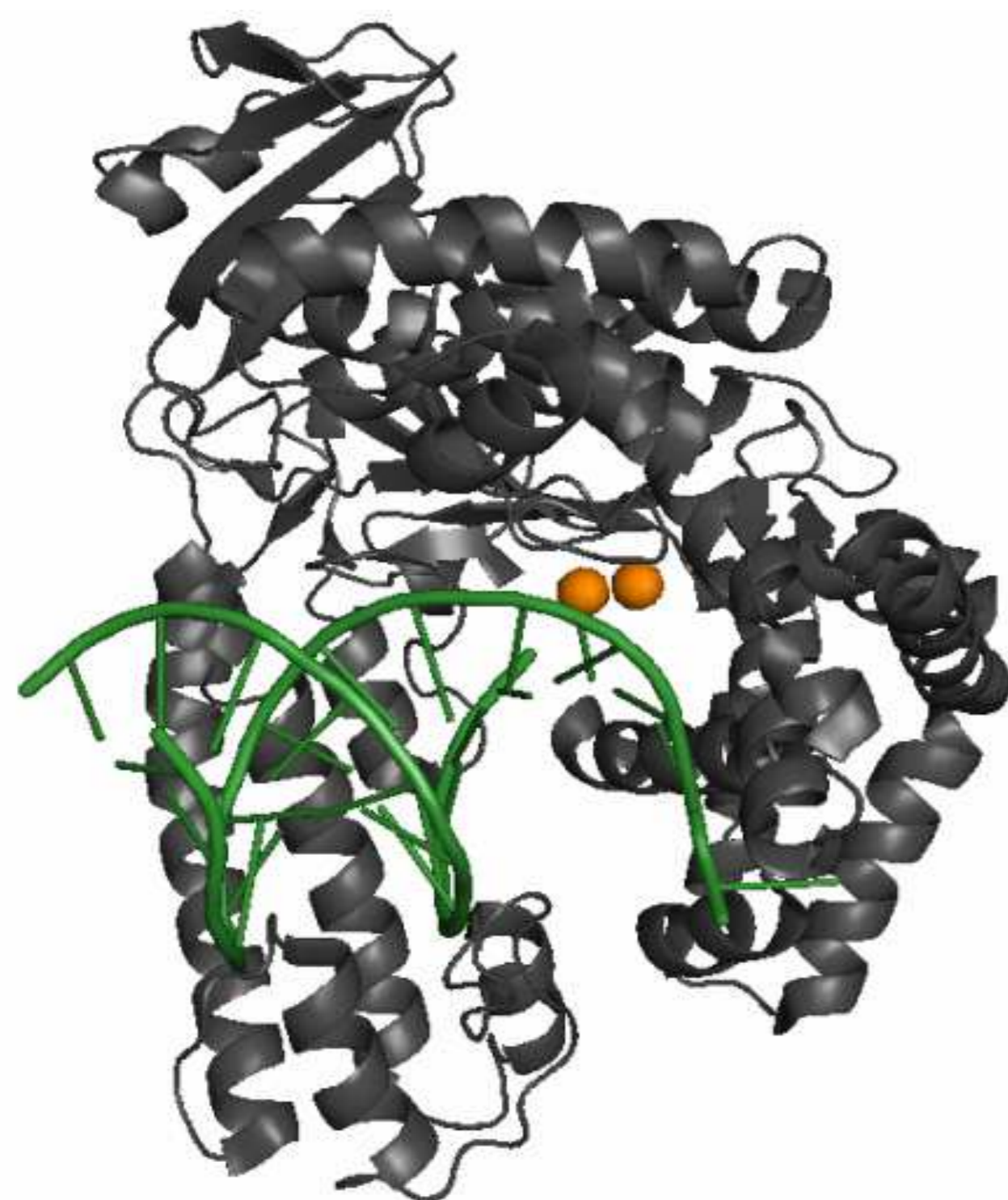


Получение активной Таq-полимеразы

Иванова Ю.О., Коноваленко М.Д., Рюмин К.Д., Устинова М.И., Субботина Е.С., Метелёв М.В.

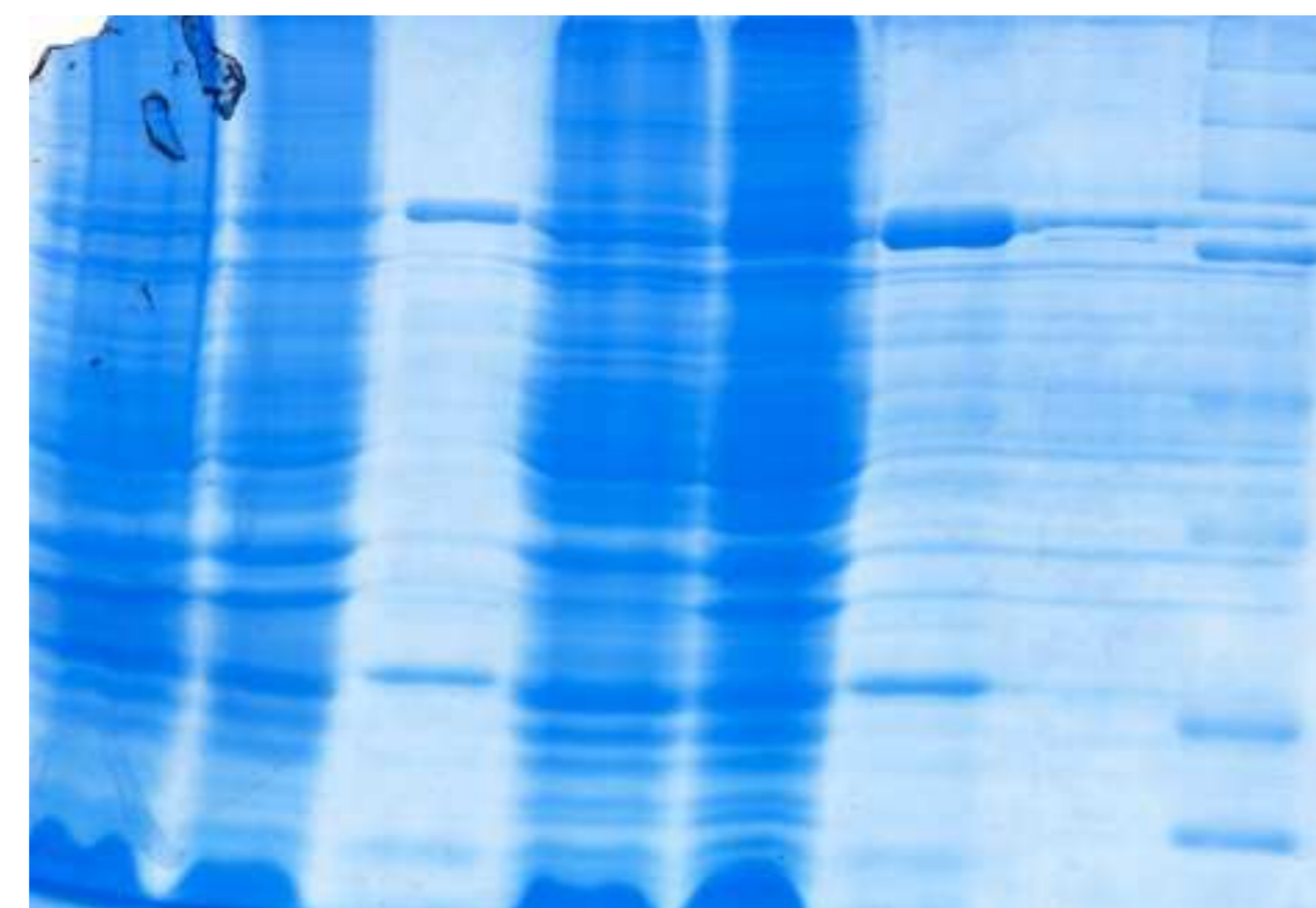
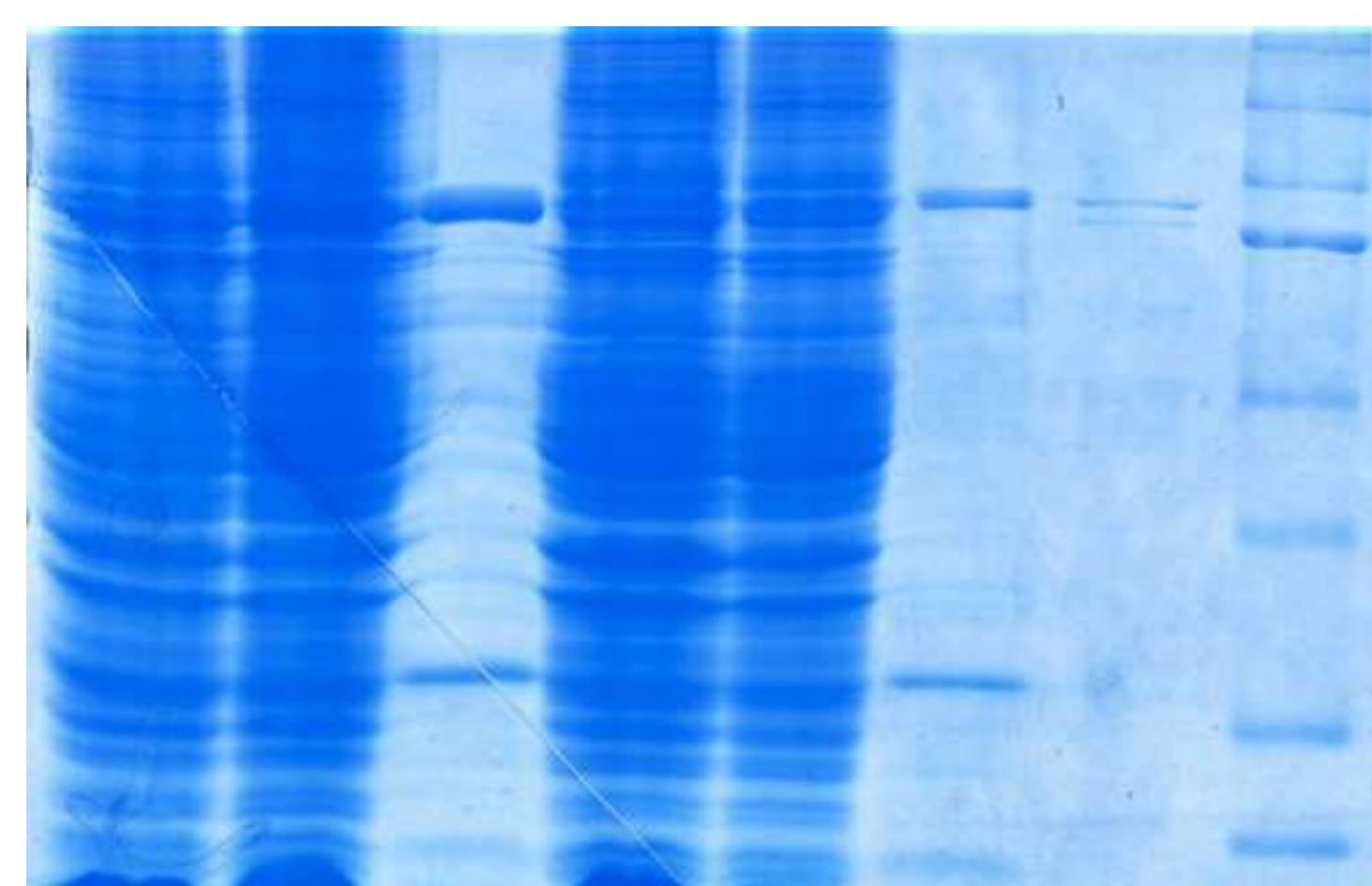
Таq-полимераза

- ДНК-зависимая ДНК-полимераза
- Выделена из термофильной бактерии *Thermus Aquaticus*
- Термостабильна (активна при 72°C)
- Широко применяется в ПЦР
- Вес – 94 кДа



Ход работы

1. В культуре клеток *E. Coli*, несущих плазмиду с геном Таq-полимеразы, находящимся под регулируемым *lac*-промотором, индуцировали экспрессию полимеразы добавлением IPTG. Белок экспрессировали в течение 15 часов при T=37°C
2. Разрушили клетки раствором лизоцима, Triton X-100 и Tween 20.
3. Выделили белковую фракцию; термическим воздействием очистили полимеразу от остальных белков.
4. Проверили качество очистки при помощи электрофореза в полиакриламидном геле (Рис. 1)



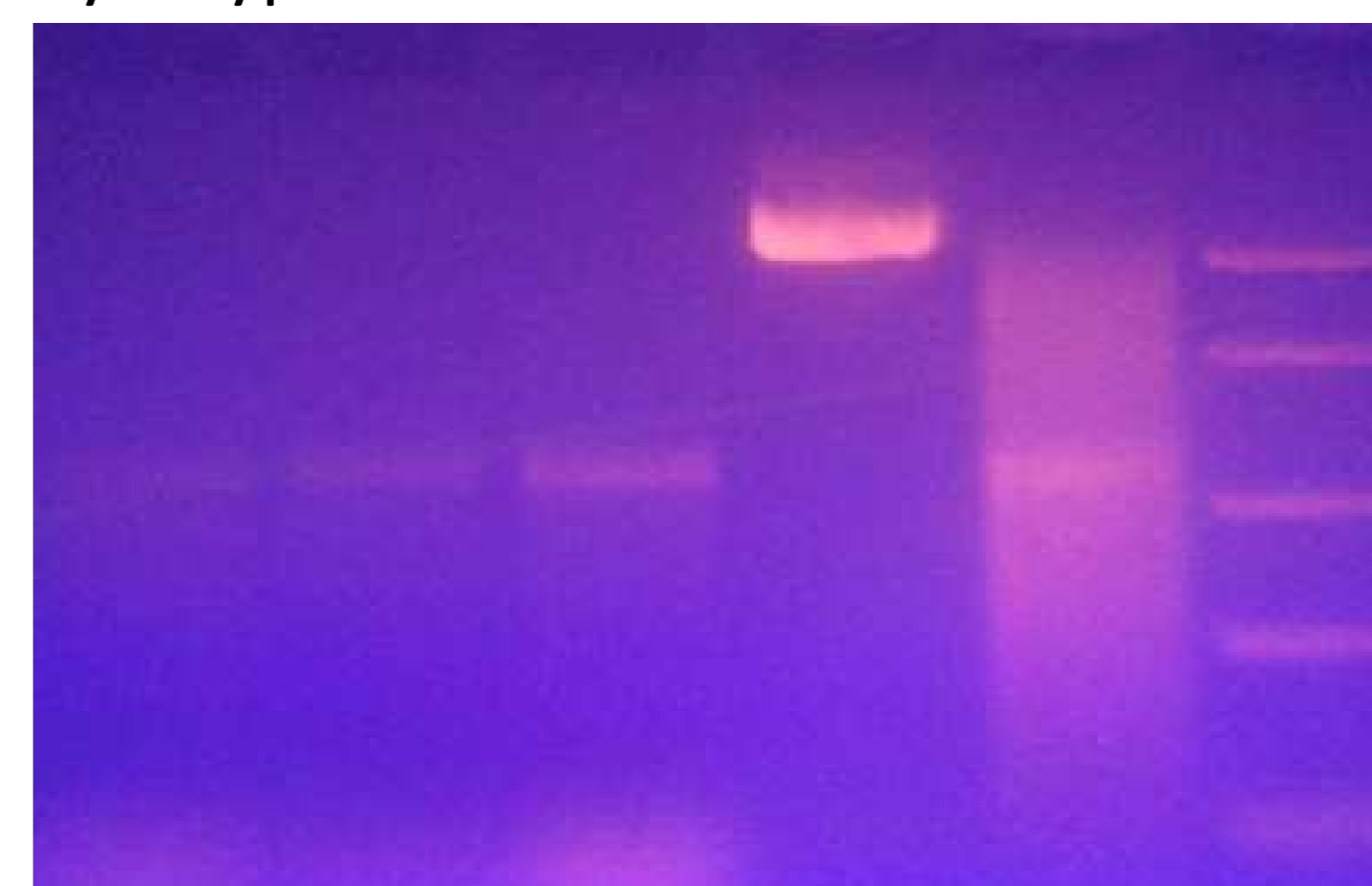
1 2 3 4 5 6 7 8

1 2 3 4 5 6 7 8

Рис. 1. Очистка Таq-полимеразы. На дорожках: 1,4 - Проба клеточной культуры(контроль); 2,5 - Проба клеток после индукции IPTG ;3,6 - Белковая фракция после термической обработки ;7 – Лабораторная Таq-полимераза; 8 - Маркер

Цель работы – выделение и очистка активной Таq-полимеразы из *E. coli*, трансформированных плазмидой, несущей соответствующий ген

5. Проверили активность Таq-полимеразы проведением ПЦР, в качестве матрицы использовалась ДНК участников проекта, была определена их половая принадлежность. (по методу описанному в статье Nakahori Y, Hamano K, etc. “Sex identification by PCR using X-Y homologous primer ”)
6. Рестрикцией по сайту XhoI подтвердили наличие гена Таq-полимеразы в плазмиде, выделенной из данной культуры клеток



1 2 3 6

Рис. 2. Проверка активности Таq-полимеразы. Дорожки 1,2,3 – продукт ПЦР, 6-маркер

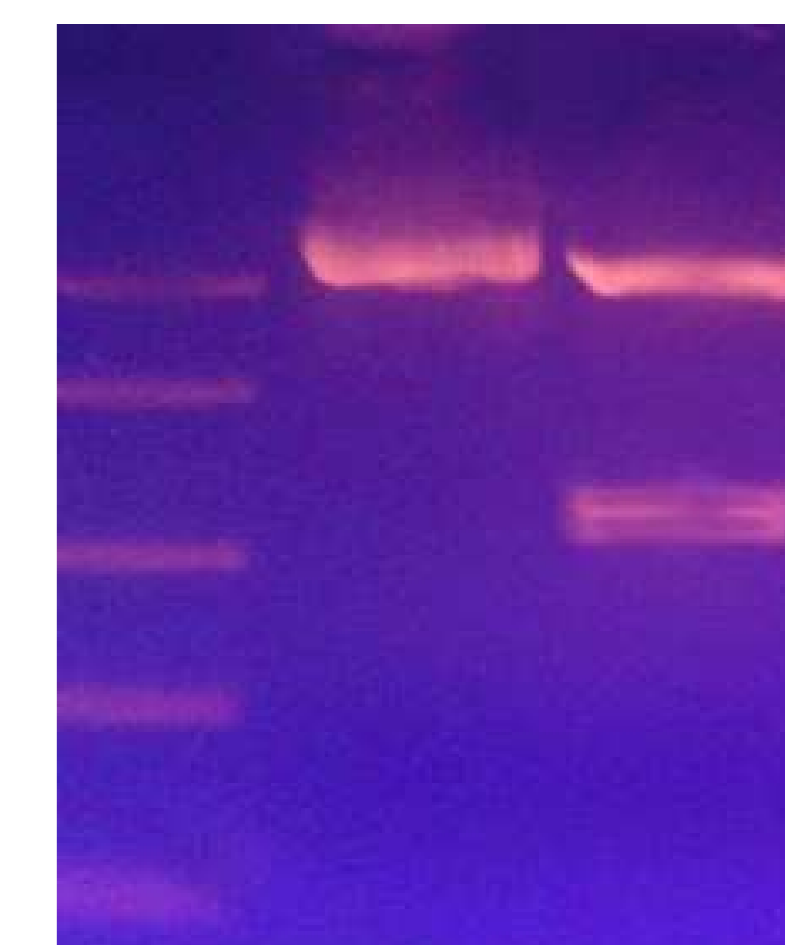


Рис. 3. Рестрикционный анализ плазмиды с геном Таq-полимеразы

Вывод

Полученная нами активная Таq-полимераза сравнима по чистоте с лабораторной, но намного дешевле.