

Выделение и характеристика протеолитических ферментов плесени

Боброва Н.А., Богданов И.А., Борисова М.В., Мухаметова В.В., Полегаева Е.М., Проценко Е.А., Седелников Л.О., Соколова В.В.

Введение.

Многие растения синтезируют ингибиторы против протеолитических ферментов, чтобы защищаться от паразитирующих микроорганизмов, однако сами атакующие ферменты мало изучены.

Задача работы состоит в выделении и характеристике протеолитических ферментов из плесени, паразитирующей на хлебе и чае.

Выводы.

Были выделены и очищены методом аффинной хроматографии белки из плесени, паразитирующей на хлебе и чае.

Была изучена протеолитическая активность белков с помощью спектрофотометрии.

Фермент из хлебной плесени характеризуется $k_{cat}/k_m = 71.4 \text{ 1}/(с*г_{белка})$

Фермент из чайной плесени обладает $k_{cat}/k_m = 1.1 \text{ 1}/(с*г_{белка})$

Охарактеризована молекулярная масса с помощью электрофореза.

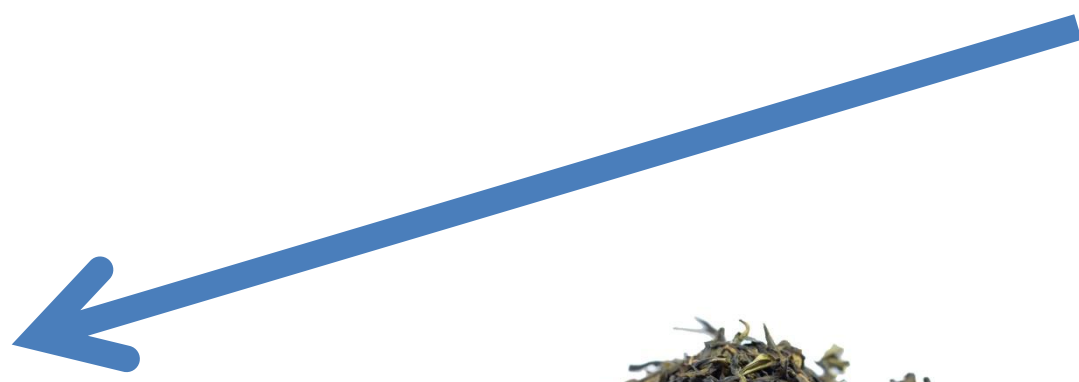
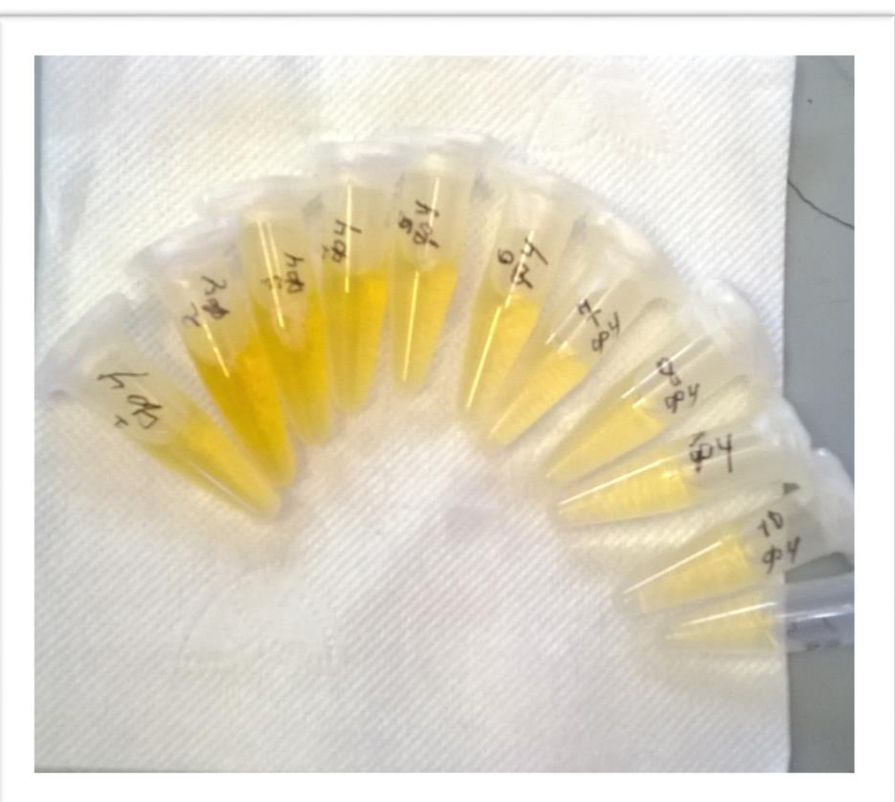
Ход работы

Подготовка экстракта плесени

- Гомогенизация плесени
- Экстракция белков раствором 0,1% NaCl
- Фильтрация через складчатые фильтры
- Фильтрация через 0,22 мкм мембрану
- Центрифугирование для осаждения не разрушенных частей клетки
- Фильтрация через 0,22 мкм мембрану
- Концентрирование белка с помощью центрифужных модулей Amicon 3 kDa



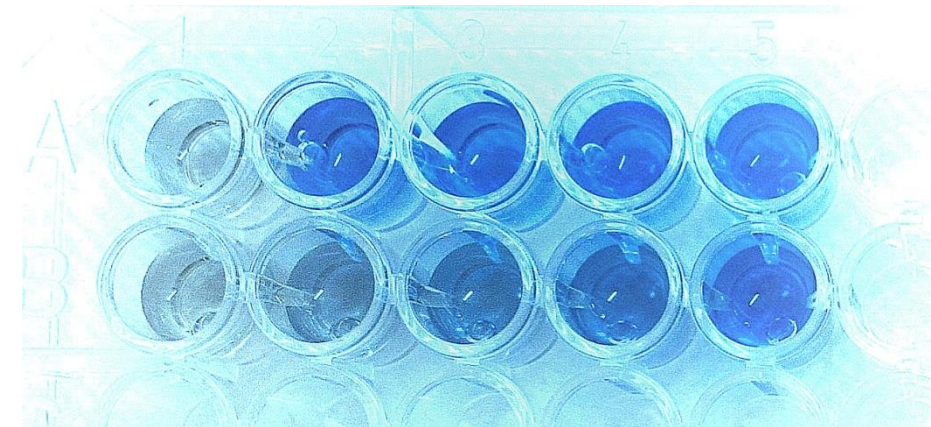
Аффинная хроматография



Подготовка хроматографической колонки

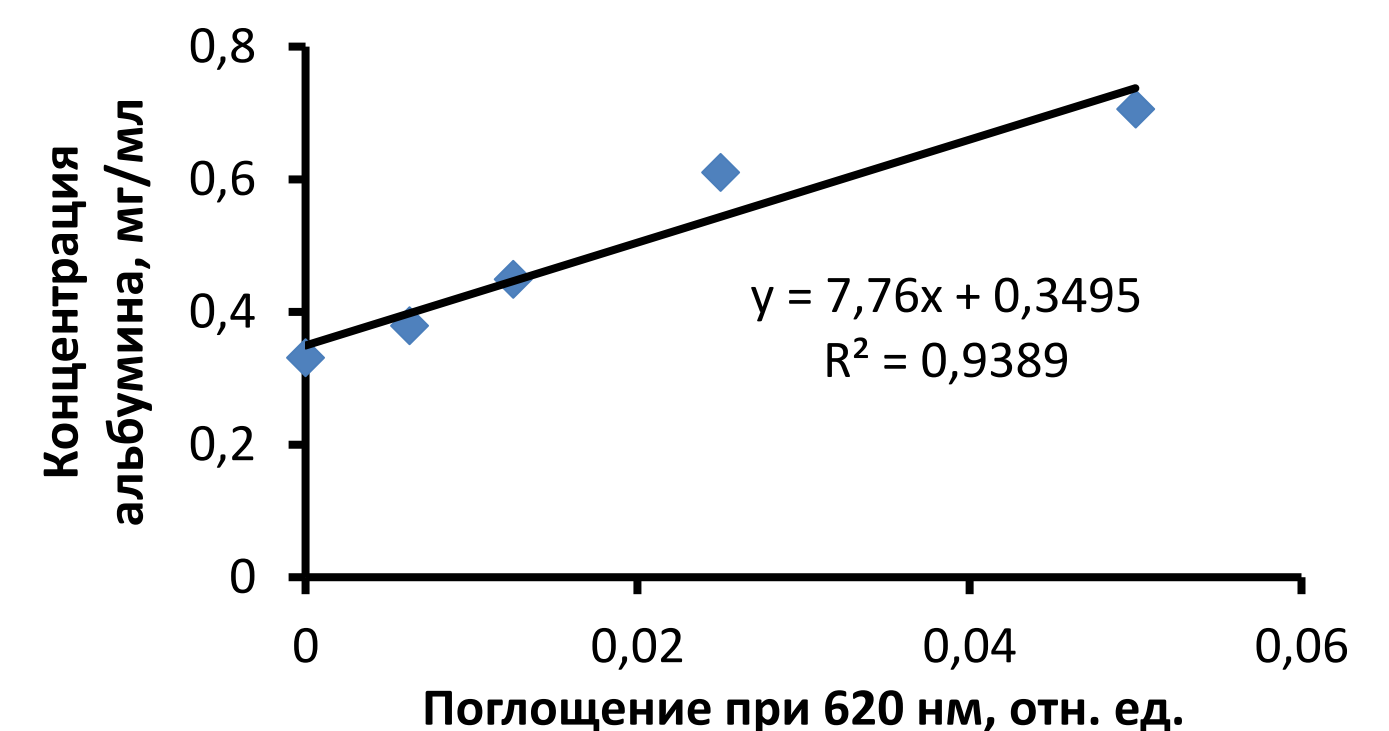
- Промывка смолы 1мМ HCl в течение ночи при температуре +4°C
- Набивка колонки смолой
- Промывка пятикратном объёмом воды
- Промывка пятикратным объёмом фосфатного буфера
- Инкубация смолы с ингибитором трипсина из кукурузы (1мг/1мл) в течение ночи при +4°C
- Инкубация смолы с глицином в течение 1,5 часа (0,2 М) при комнатной температуре
- Промывка смолы от не связавшегося глицина PBS и ацетатным буфером

Измерение концентрации белков методами Бредфорда и Биценхоновой кислоты



Хлебная плесень

№ пробы	1	2
С, мг/мл	0,04	0,02



Чайная плесень

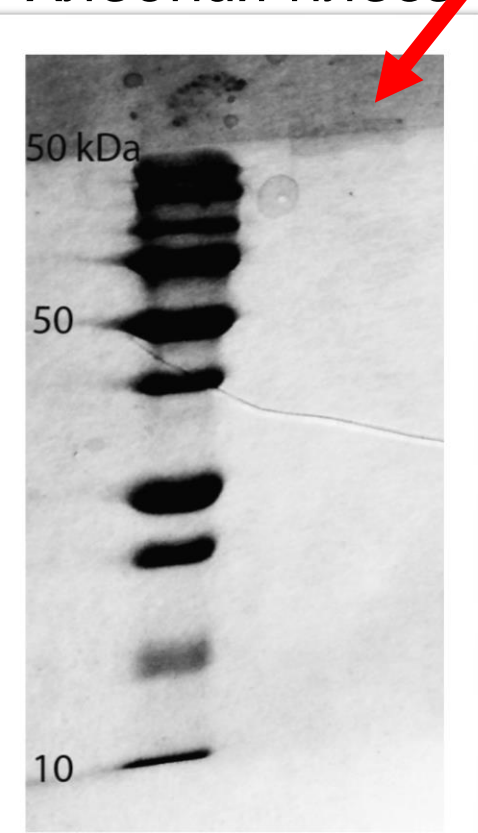
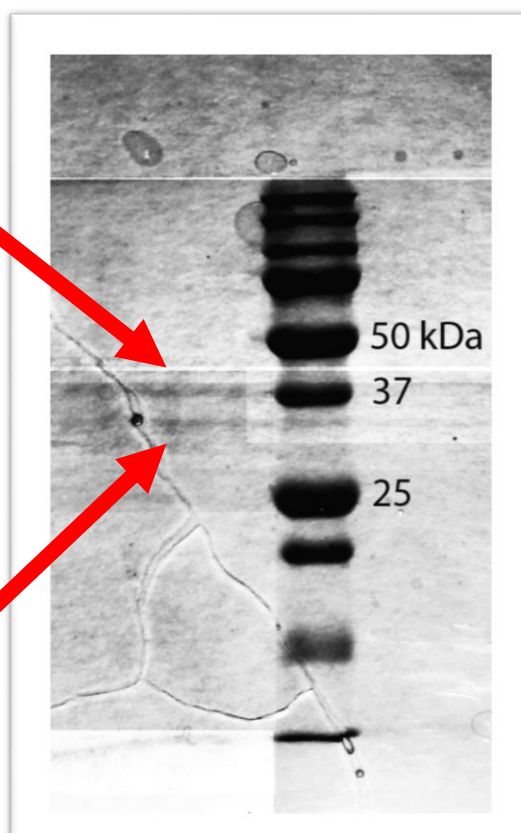
№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
С, мг/мл	0,18	0,21	0,16	0,15	0,07	0,18	0,03	0	0	0,004	0,01

Проведение электрофореза в полиакриламидном геле



Чайная плесень

Хлебная плесень



Определение протеолитической активности спектрофотометрическим методом

